

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia



TESIS DOCTORAL

Cistorreceptores dopaminérgicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Concepción Idoipe Tomás

DIRECTOR:

Felix Sanz Sánchez

Madrid, 2015

María Concepción Idoipe Tomás

TP
1981
050



x-53-223081-6

CISTORRECEPTORES DOPAMINERGICOS

Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© M^a Concepción Idoipe Tomás
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-3919-1981

I.

M^a CONCEPCION IDOIBE TOMAS

"CISTORRECEPTORES COPAMINERGICOS"

Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Félix Sanz
Sanchez, Catedrático - Director del Departamento de Far
macología de la Facultad de Veterinaria de la Universi-
dad Complutense de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

AÑO 1980



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

D. FELIX SANZ SANCHEZ, Catedrático y Director del
Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facul-
tad de Veterinaria de la Universidad Complutense de
Madrid,

CERTIFICA: Que Dña. Ma CONCEPCION IDOIBE TOMAS,
licenciada en Farmacia, ha realizado en
este Laboratorio de Farmacología el tra-
bajo para la Tesis Doctoral para su pre-
sentación en la Facultad de Farmacia de
esta Universidad y titulado "Cistorrecep-
• tores dopaminérgicos", encontrándose en la
actualidad en condiciones para su presen-
tación.

Lo que certifico para los efectos oportunos
en Madrid a diecisiete de marzo de mil nove-
cientos ochenta.



II.

A mis padres y hermanos

III.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección del Prof. Dr. D. Félix Sanz Sanchez, Catedrático - Director de dicho Departamento, y teniendo como Ponente al Prof. Dr. D. Gregorio Varela Mosquera, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

IV.

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Felix Sanz Sánchez, Catedrático de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por su acogida, entusiasmo y estímulo, poniendo a mi alcance cuantos medios fueron necesarios para llevar a cabo esta investigación, sin cuya valiosa enseñanza y dirección no hubiera sido posible su realización.

Al Prof. Dr. D. G. Varela Mosquera, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser el ponente de la presente Memoria en la Facultad de Farmacia.

A mi hermana Angela, que de manera permanente e incondicional me ha prestado su colaboración y ayuda.

A mis compañeros de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, especialmente al Dr. D. Arturo Anadón y a D. José Vicente Tarazona, por su cooperación a lo largo de esta investigación.

A los Sres. Juan Poza y José García por la ayuda prestada en el suministro de los animales de experimentación.

V.

INDICE

	<u>Fag.</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1. Receptores dopaminérgicos. Generalidades	1
I.2. Fisiología vesical	2
I.3. Distribución nerviosa en la vejiga urinaria de co- bayo	3
I.3.1. Inervación intrínseca	3
I.3.2. Inervación extrínseca	5
I.4. Inervación y receptores vesicales	8
I.4.1. Inervación y receptores vesicales simpáticos y parasimpáticos	8
I.4.1.1. Parasimpáticos	8
I.4.1.2. Simpáticos	13
I.4.2. Cistorreceptores triptaminérgicos	16
I.4.3. Cistorreceptores histaminérgicos	21
I.4.4. Terminaciones nerviosas purinérgicas.....	22

VI.

I.4.5. Receptores morfinicos	27
I.4.6. Receptores dopaminérgicos	30
II. MATERIAL Y METODOS	48
II.1. Tipos de ensayos	48
II.1.1. Estudio del comportamiento farmacológico vesical	48
II.1.2. Captación de ³ H - dopamina "in vivo" e "in vitro"	49
II.2. Método de trabajo	49
II.2.1. Ensayos sobre el comportamiento espontáneo y respuestas a la estimulación eléctrica vesical	49
II.2.1.1. Preparación "in vitro"	49
II.2.1.2. Preparación "in vivo"	51
II.2.1.3. Baños de órganos y electrodos	52
II.2.1.4. Estimulación eléctrica y registro	54
II.2.2. Ensayos sobre la captación de ³ H - dopamina	56
II.2.2.1. Ensayos "in vivo"	57
II.2.2.2. Ensayos "in vitro"	59
II.3. Soluciones	61
II.4. Fármacos	63

VII.

III. RESULTADOS	68
III.1. Acción Farmacológica sobre la motilidad espontánea y respuestas a la estimulación en los diferentes preparados vesicales	68
III.1.1. Copamina	71
III.1.1.1. Acción sobre la motilidad espontánea vesical	71
III.1.1.2. Acción sobre las respuestas a la estimulación eléctrica	75
III.1.2. Apomorfina	83
III.1.2.1. Acción sobre la motilidad espontánea vesical	83
III.1.3.2. Acción sobre las respuestas a la estimulación eléctrica	91
III.1.3. Haloperidol y azaperone	104
III.1.3.1. Acción sobre la motilidad espontánea vesical	104
III.1.3.2. Acción sobre las respuestas a la estimulación eléctrica	107
III.1.4. Estudio estadístico	115

VIII.

III.2. Captación de ^3H - dopamina	124
III.2.1. Captación "in vivo" de ^3H -dopamina en vejiga de cobayo	124
III.2.2. Captación "in vitro" de ^3H - dopamina en homogeneizado de vejiga de cobayo	128
IV. DISCUSION	140
V. CONCLUSIONES	156
VI. BIBLIOGRAFIA	161

PRESENTACION

Es conocida desde hace años la existencia de diversos receptores en la fibra lisa. Los primeros estudiados fueron los receptores adrenérgicos alfa y beta, los colinérgicos, los triptaminérgicos o serotoninérgicos y los histaminérgicos H_1 y H_2 . Más tarde se ha descubierto la presencia de unas terminaciones nerviosas liberadoras de purinas nucleótidas y de unos receptores a los que se ha llamado respectivamente purinérgicos.

Recientemente se han venido describiendo a nivel del sistema nervioso central una serie de receptores opiáceos, cuya presencia a nivel de la fibra lisa se ha confirmado posteriormente.

Un hecho análogo ha sucedido con la descripción de receptores dopaminérgicos, de localización nerviosa central e intestinal.

Por lo que se refiere a la vejiga de la orina, se ha señalado y comprobado la existencia de receptores convencionales. Se recogen además en la literatura pequeñas referencias acerca de la acción de los nervios purinérgicos, pero no hemos hallado trabajos, a excepción de los nuestros, sobre receptores opiáceos y dopaminérgicos a nivel vesical.

En efecto, los receptores dopaminérgicos se han venido observando en una gran variedad de órganos como controladores de las funciones de los mismos, pero todavía es una cuestión problemática que su efecto sea específico sobre el músculo liso. Varias publicaciones han sugerido que el efecto sobre los receptores postsinápticos dopaminérgicos en el músculo liso y vascular o del tracto gastrointestinal justificaría los efectos de la

X.

dopamina. Este tejido responde a la dopamina o a los agonistas de la misma, así como también a los antagonistas, aunque este efecto de los antagonistas varía al menos cuantitativamente en los diferentes órganos.

La heterogeneidad química de los compuestos agonistas de la dopamina y la dificultad en la caracterización de los receptores de este tipo, utilizando las técnicas convencionales para la exploración de receptores, han sugerido la posibilidad de que pueda ser debido a un efecto directo o a mecanismos de diferente naturaleza y extraños al receptor.

La presente investigación trata de poner de manifiesto por diferentes técnicas la presencia o ausencia de cistorreceptores dopaminérgicos a nivel vesical.

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

I. 1.- Receptores dopaminérgicos. Generalidades.

Los receptores son macromoléculas que tienen por función el reconocimiento de forma específica de la molécula efectora a la cual ellos corresponden. Establecen con ella una unión induciendo la activación de un sistema biológico dado. CUATRECASAS postuló en 1975 (citado por JACOB et al., 1978) los criterios que debe satisfacer la unión de un ligando a receptores específicos, que se resumen en los siguientes puntos:

- a) Unión específica, y estereoespecífica si hay lugar a ello.
- b) Unión saturable, lo que implica un número limitado de receptores.
- c) Afinidades relativamente altas.
- d) Distribución de los lugares de unión concordante con las zonas sensibles al ligando estudiado.
- e) Unión reversible.

Estos criterios no son limitativos y se pueden adoptar otros. Por otra parte, tampoco tienen cada uno en particular un valor absoluto excluyente.

El reconocimiento específico de las moléculas efectoras agonistas por las moléculas receptoras, desencadena una serie de procesos que en último término, traen como consecuencia la producción del efecto far-

macológico. Este no es el caso de las moléculas antagonistas que, por su conformación estructural, cumplen los requisitos que les permiten unirse a los receptores, pero la consecuencia de esta unión no es la producción del citado efecto farmacológico, sino por el contrario, el bloqueo del receptor que no puede unirse a los agonistas para que tenga lugar tal proceso.

I. 2.- Fisiología vesical.

La vejiga y las porciones prostáticas y membranosas de la uretra constituyen una unidad fisiológica cuya función es permitir la acumulación vesical de la orina proveniente del riñón (fase de colección) y la evacuación de ésta al exterior (fase de expulsión).

Para cumplir estos fines la vejiga posee una túnica muscular formada por fibras musculares lisas que se disponen en tres capas concéntricas, de forma que la contracción de estos músculos (detrusor urinae) determina una disminución en la capacidad de la vejiga.

La capa externa está constituida por fibras longitudinales que se dirigen desde el fondo (fundus) de la vejiga hasta su base, mientras que la capa interna está formada por fibras longitudinales anastomosadas entre sí y, por el contrario, la capa media se compone de fibras circulares, que en la región del cuello se condensan para formar un músculo anular alrededor del orificio uretral ó esfínter interno de la uretra; las fibras transversales son más largas y más fuertes que las longitudinales. (MANTEGAZZA y NAIMZADA, 1967a).

El nombre de músculo detrusor de la orina debería ser fisiológicamente aplicado al conjunto de las tres capas, ya que todas actúan como una sola, contrayendo la vejiga y haciéndola disminuir de tamaño.

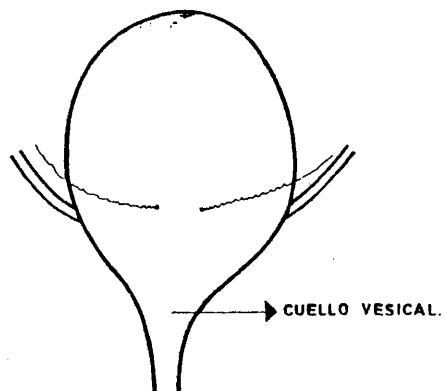
La vejiga urinaria de cobayo se halla situada en la parte inferior del abdomen, detrás del pubis. Los uréteres se dirigen juntos hacia la pelvis, y a la altura de la bifurcación de la aorta se separan, atraviesan el mesourogenital y se abren en la vejiga por una vía dorsal. Normalmente en el estado de vacuidad la vejiga urinaria tiene el volumen de un guisante y es redonda. La capa vesical anterior está unida en la región inferior por medio de un corto ligamento vesicopubiano a la pared abdominal inferior. Lateralmente está fijada por los ligamentos laterales y en la cara posterior se une por medio de tejido conjuntivo a la cara inferior de la vagina, en el caso de las hembras (G. HOFFMANN, 1963) (Figura nº 1).

I. 3.- Distribución nerviosa en la vejiga urinaria de cobayo.

Aunque la innervación de la vejiga urinaria en general y la del cobayo en particular, es conflictiva, se puede decir que posee una doble innervación: intrínseca y extrínseca. La innervación intrínseca está constituida por los plexos intramusculares y es incapaz de desencadenar por sí misma el fenómeno de la micción. En cuanto a la innervación extrínseca, está constituida por dos tipos de fibras, motoras, y sensitivas.

I. 3. 1.- Innervación intrínseca:

Cara vesical anterior.



Cara vesical posterior.

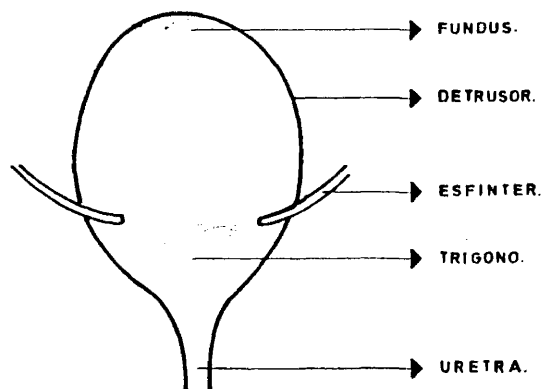


Figura: 1

Cara vesical anterior y posterior.

La red pseudonerviosa intrínseca ó metasimpática juega un papel importante a nivel vesical, ya que las terminaciones nerviosas correspondientes a la inervación extrínseca de la vejiga, no actúan directamente sobre los elementos musculares, sino por intermedio de esta red difusa pseudonerviosa del sistema autónomo vesical. Es fundamental establecer esta diferencia, dada la arraigada creencia de que el nervio pélvico inerva directamente el detrusor, el hipogástrico el esfínter interno y el pudendo el esfínter externo y uretra membranosa.

Aceptar la inervación de los sistemas musculares antagónicos directamente por los nervios que emanan del neuroeje, equivaldría a producir una parálisis total y definitiva de estas formaciones musculares, después de la sección de dichos nervios. Y sin embargo lo mismo la experimentación animal que la observación clínica, demuestran lo contrario. En cambio admitiendo el concepto de la vejiga neuro - muscular, se comprende que la denervación completa de la vejiga, si bien de momento provoca trastornos, rápidamente recupera su funcionalismo normal o casi normal.

I. 3. 2.- Inervación extrínseca.

A) Inervación motora.

A nivel de la médula sacra se encuentra el centro vesicoespinal de la micción, que es un centro de naturaleza parasimpática, localizado en las astas anteriores de la sustancia gris medular, donde convergen vías motrices aferentes y eferentes.

Las vías motrices aferentes se originan en los centros cortica-

les y por la parte lateral de la médula alcanzan el centro de la micción. Estas vías tienen como función la regulación consciente de la micción.

Las vías motrices eferentes están constituidas por fibras somáticas y vegetativas. Las fibras somáticas forman el nervio pudendo que tiene su origen en el cordón sacro. Las fibras vegetativas forman los nervios pélvicos (parasimpáticos); que también tienen su origen en el cordón sacro y los nervios hipogástricos (simpáticos) que se originan en la región lumbar de la médula.

El origen y camino de estos nervios hacia la vejiga urinaria difiere mucho no sólo de especie a especie, sino también de animal a animal dentro de la misma especie, e incluso de lado derecho a izquierdo en el mismo individuo (GAUBER, 1933).

Algunas de las fibras de los nervios pélvicos se mezclan con fibras de los nervios hipogástricos y forman el plexo hipogástrico, de donde pasan al plexo vesical y entran en el músculo vesical. Por lo tanto algunas de las fibras preganglionares terminan en los ganglios del plexo hipogástrico, mientras que otras van directamente a los ganglios del plexo vesical. En el primer caso las fibras postganglionares son largas y en el segundo cortas. Las fibras del nervio pélvico inervan el fundus, la porción media, el cuello y el esfínter interno vesical.

En lo que se refiere al nervio hipogástrico, las fibras preganglionares tienen su sinapsis con neuronas postganglionares situadas en los ganglios del plexo hipogástrico, de estas sinapsis salen fibras postganglionares que se dirigen al trigono, meatos ureterales y esfínter interno (MASARUKURU, 1965).

B) Inervación sensitiva.

Tanto los nervios pélvicos como los hipogástricos llevan fibras sensoriales, de forma que el aumento de la presión intravesicales registrado por receptores vesicales y a través de los nervios pélvicos alcanza, por las raíces posteriores, el centro de la micción, enviando la sensación por el fascículo posterior al centro cortical.

Del mismo modo, la sensibilidad térmica, táctil y dolorosa se transmiten a partir de receptores de la propia mucosa vesical a través del nervio pélvico. Sin embargo, la sensibilidad visceral ó de distensión abdominal se emite por vía simpática, con receptores en el trigono y meatos ureterales.

En los mamíferos en general la excitación de los nervios pélvicos provoca la contracción de la totalidad de la pared de la vejiga con un aumento de la presión intravesical, que, junto con la simultánea inhibición del esfínter, produce un vaciamiento total de la vejiga. Por tanto estos nervios son los más importantes para el acto de la micción, interviniendo fundamentalmente en la fase de expulsión de la orina.

Por el contrario, el estímulo de los nervios hipogástricos provoca la contracción del trigono y del esfínter, la abertura de los uréteres y una cierta relajación del detrusor de la vejiga. Por tanto estos nervios intervienen principalmente en la fase de colección de la orina.

Sin embargo, aunque parece que normalmente están en acción ambos tipos de nervios, en el control de la funcionalidad vesical, la

inervación simpática es de menor importancia que la parasimpática.

A la vista de esta descripción morfológica y funcional de la vejiga urinaria, queda aún todo en conflictividad, máxime si comparamos los estudios clásicos (figura nº 2) con los actuales.

En efecto, la inervación vesical en su doble aspecto intrínseco y extrínseco ha sido objeto de estudio por parte de diversos autores, que han llegado a conclusiones no siempre concordantes y definitivas en cuanto a los diferentes tipos de receptores existentes en vejiga, su distribución y a la funcionalidad simpática y parasimpática de los nervios hipogástricos y pélvicos.

Se pretende por ello a lo largo de esta memoria aclarar algunas de las lagunas existentes en este campo.

I. 4.- Inervación y receptores vesicales.

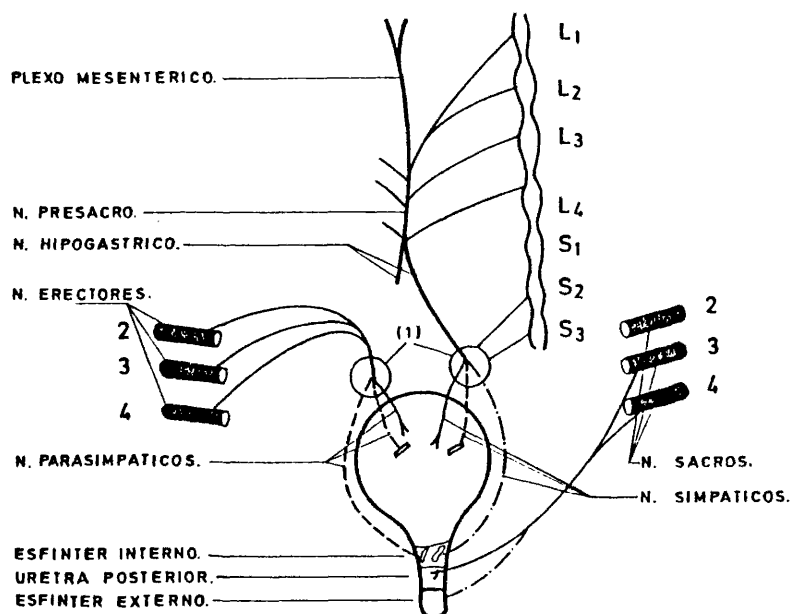
I. 4. 1.- Inervación y receptores vesicales simpáticos y parasimpáticos.

•

I. 4. 1. 1.- Parasimpáticos.

A lo largo de los últimos años distintos autores han demostrado la presencia de fibras nerviosas colinérgicas tanto en los nervios pélvicos como en los hipogástricos de rata y cobayo, así como de fibras nerviosas postganglionares adrenérgicas en ambos nervios, pélvicos e hipogástricos de cobayo, rata y otros animales de experimentación.

Por otra parte, también se ha puesto de manifiesto la existen-



— Fibras aferentes.
 - - - Eferentes motores.
 . . . Eferentes inhibidores.
 (1) Ganglios hipogástricos.

Figura: 2

Esquema de LEARMONTH.

cia de unos receptores colinérgicos vesicales sobre los que la atropina no es capaz de ejercer un bloqueo completo, hecho que como veremos más adelante, se ha interpretado de diferente forma según los distintos autores, no quedando claro el mecanismo de bloqueo.

En efecto, URSILLO (1956) puso en evidencia la naturaleza colinérgica de la transmisión nerviosa en la vejiga de perro, así como la obtención de un bloqueo parcial de la respuesta a la estimulación nerviosa de la misma por elevada dosis de atropina, de acuerdo con las originales observaciones de LANGLEY y ANDERSON (1895) y de HENDERSON y ROEPKE (1934, 1935) que no fueron capaces de bloquear la contracción inicial producida por la estimulación del nervio pélvico en vejiga de perro, sugiriendo todo ello que los receptores activados por la liberación nerviosa de acetilcolina eran inaccesibles a la atropina. A estas mismas conclusiones también se ha llegado utilizando preparaciones neuromusculares de vejiga de conejo en las que la estimulación nerviosa era puramente postganglionar ya que la respuesta no se bloqueaba por el hexametomio ni por el tetraetilamonio.

URSILLO (1956) comprobó en sus ensayos que el bloqueo de la respuesta a acetilcolina y su recuperación es más rápido que el correspondiente a la estimulación del nervio, en función de lo cual propuso que la atropina podría antagonizar la respuesta a la estimulación del nervio y a la de acetilcolina independientemente y en lugares diferentes, siendo el lugar de antagonismo de acetilcolina más accesible al agente bloqueante.

Tratando de explicar estos hechos, DALE y GADUN (1930) expusieron la "teoría de la proximidad", según la cual la acetilcolina se libera

ba en las terminaciones nerviosas en tan íntima relación con los receptores que la atropina no podía impedir su acceso a ellos. Una teoría similar fué propuesta posteriormente por CHESCHER en 1970.

Este mismo problema ha sido abordado por otros investigadores como SINGH (1964); AMBACHE y ZAR (1970); DUNSDAY (1971) y BURNSTOCK et al, (1972) que, en rata, cobayo, gato y conejo respectivamente, sugirieron que algunos de los nervios parasimpáticos resistentes a la atropina eran de naturaleza no colinérgica, lo que podría explicar la resistencia a la atropina de las respuestas a la estimulación nerviosa vesical.

Sin embargo, LANGLEY, ANDERSON (1895), EDGE (1955) URSILLO y CLARK (1956), URSILLO (1961) y HUKOVIC et al. (1965) afirman previamente que la resistencia a la atropina no es evidencia de la naturaleza no colinérgica de los nervios pélvicos, ya que en favor de la naturaleza colinérgica se encuentran las observaciones de que la fisostigmina potencia la respuesta a la estimulación eléctrica de los nervios pélvicos y que el hemicolínium la bloquea. Según esto, BURNSTOCK y CAMPBELL, (1963) afirman que estos nervios contienen fibras colinérgicas postganglionares y las respuestas a la estimulación nerviosa resistentes a atropina podrían ser debidas a una inversión competitiva del bloqueo atropínico por elevadas concentraciones locales de acetilcolina liberada en las terminaciones nerviosas.

A pesar de ello, ELMER (1975) ha observado que la relajación del músculo detrusor cuando se somete a cortos periodos de estimulaciones abolida por la guanetidina, indicando que dicha relajación es originada por la estimulación de fibras adrenérgicas, hecho que se ha demostrado histoquí-

micamente en la rata, tanto para los nervios pélvicos como para los hipogástricos, aunque según WAKADE y KIRPEKAR (1972) esto no se presenta en cobayo.

De la misma manera se ha demostrado la presencia de fibras nerviosas postganglionares colinérgicas en ambos nervios pélvicos e hipogástricos, hecho corroborado por HAMBERGIER y NORBERG (1965) WAKADE y KIRPEKAR (1972) y SUNDIN y DAHLSTION (1973) en el gato, y por SIGG y SIGG (1964), MANTEGAZZA y NAIMZADA (1967b), DE SY (1972) y SUNDING y DAHESTROM (1973) en cobayo y otros animales de experimentación.

GARRY y GILLESPIE (1955) y WEETMAN (1972) corroboraron estos hallazgos utilizando vejiga aislada e inervada de cobayo, apoyándose en la óptima estimulación alcanzada, incapaz de ser bloqueada por la guanetidina, lo que excluye que la estimulación hubiera sido mediada por inervación adrenérgica.

ELMER (1975) explica estos fenómenos afirmando que el músculo detrusor se activa por fibras colinérgicas cuando los nervios pélvicos parasimpáticos ó los nervios hipogástricos simpáticos se estimulan con pulsos de frecuencias consideradas como fisiológicas. Ahora bien, el músculo detrusor de la vejiga urinaria de la rata contiene receptores alfa adrenérgicos ó excitatorios y beta adrenérgicos o inhibitorios. Estos receptores pueden ser activados a través de los nervios vesicales utilizando elevadas frecuencias y cortos periodos de estimulación respectivamente. De esta manera, estimulando a elevadas frecuencias los nervios pélvicos ó hipogástricos se incrementa la contracción de respuesta, posiblemente por medio de fibras adrenérgicas que activan los receptores alfa excitatorios

mientras que con cortos periodos de estimulación se produce como respuesta una relajación que se lleva a cabo a través de las fibras adrenérgicas que activan los receptores beta inhibitorios.

Por otra parte, no se explica claramente la acción de ciertos bloqueantes ganglionares, como hexametonio y pentolino, que producen un bloqueo incompleto en la vejiga aislada e inervada de cobayo (WALKER y WEETMAN, 1970; WEETMAN y TURNER, 1973) así como de nicotina y dimetilfenilpiperacina (PATON y PERRY, 1953) proponiéndose para su acción un mecanismo poco frecuente de mediación neurohumoral (DUMSDAY, 1971) y concluyéndose en la existencia de fibras pregangliónicas y postgangliónicas en las preparaciones aisladas e inervadas de la vejiga de cobayo (WEETMAN y TURNER, 1973).

LEVI y AHLQUIST (1962), TRENDELENBURG (1966), SMITH (1966), TAIRA et al (1969), y TAIRA, et al, (1971) abordaron el estudio de la excitación de los ganglios parasimpáticos a través de un mecanismo muscarínico, en vejiga urinaria de perro, llegando a la conclusión de que las respuestas obtenidas se debían predominantemente a la excitación de elementos neuronales colinérgicos intramurales en lugar de musculares.

I. 4. 1. 2.- Simpáticos.

Como indicabamos anteriormente, las experiencias realizadas por MANTEGAZA y NAIMZADA (1967 b) en preparaciones "in vitro" de vejiga de cobayo con inervación extrínseca simpática intacta, en las que la estimulación eléctrica repetitiva de los nervios hipogástricos provoca respuestas de contracción constantes, regulares y reproducibles durante varias horas,

permitieron afirmar a estos autores de acuerdo con GAUBER (1933) INGER-SOLL et al. (1954) y SIGG y SIGG (1964) que los nervios hipogástricos de la vejiga urinaria del cobayo contienen fibras nerviosas pregangliónicas de naturaleza colinérgica, capaces de provocar una contracción de vejiga, aunque los mecanismos colinérgicos son diferentes en algunos aspectos a los presentes en otras áreas periféricas.

Estos hechos invalidan el clásico concepto de BEST y TAYLOR (1955) de que los nervios hipogástricos proveen de fibras inhibitorias al músculo detrusor.

WAKADE y KIRPEKAR (1972) han contribuido al estudio de la inervación simpática de la vejiga urinaria del cobayo mediante métodos químicos e histológicos, encontrando que la mayor parte de la norepinefrina contenida en este órgano se concentra en los nervios simpáticos a nivel del cuello vesical y esfínter interno, quedando el resto del órgano pobremente inervado.

Por los resultados de sus experiencias estos autores han llegado a la conclusión de que la vejiga urinaria del cobayo está inervada por axones simpáticos postganglionares cortos, originados en el plexo hipogástrico derecho e izquierdo, ya que ligando estas fibras se producía una notable reducción de los niveles de norepinefrina tisular. Sin embargo, a través de la denervación bilateral de dichos axones no se conseguía una deplección completa del depósito endógeno de norepinefrina, hecho atribuible parcialmente a la presencia de ganglios simpáticos intramurales.

La presencia de receptores adrenérgicos alfa y beta en la vejiga urinaria ha sido demostrada por diversos autores en experiencias lle

vadas a cabo tanto "in vitro" como "in vivo", mediante el empleo de diferentes agonistas y agentes bloqueantes, como se deduce de los trabajos de SIGG y SIGG (1964) HUKOVIC et al. (1965) EDVARSEN, (1967) EDVARSEN y SETEKLEIV (1968), SALIMI et al. (1969) y ELMER (1975) llevados a cabo en gato, conejo, cobayo y rata, habiéndose encontrado por estos autores una actividad semejante de estos receptores en las diversas especies.

ELMER (1975) puso de manifiesto la presencia de receptores adrenérgicos alfa y beta en la vejiga urinaria "in vivo" de rata, indicando además que los adrenorreceptores vesicales beta son del tipo de los receptores beta₂ inhibitorios de otros órganos. Para llegar a esta conclusión, el autor se basó en que los agentes estimulantes selectivos de receptores beta₂ como la terbutalina y el salbutamol, producían una relajación del músculo detrusor, análoga a la producida por un agente estimulante de adrenorreceptores beta como la isoprenalina. Además, los compuestos bloqueantes de receptores beta₁ no afectaban las respuestas producidas por la isoprenalina, la terbutalina o el salbutamol, mientras que eran totalmente abolidas por el propanolol y los agentes bloqueantes de receptores beta₂.

EDVARSEN y SETEKLEIV, (1968), SALIMI et al. (1969) y NERGARCH y BOREUS (1972) han comparado la distribución de los adrenorreceptores a nivel de cuello vesical y músculo detrusor de la vejiga, no llegando sin embargo a conclusiones concordantes, quizá por la diferente metodología empleada. Sin embargo, posteriormente en 1974 AWAD et al. han aclarado la distribución de los adrenorreceptores alfa y beta en la vejiga urinaria, utilizando para ello preparaciones "in vitro" de músculo detrusor y de cuello vesical humano. Estos autores han demostrado que el cuello vesical

contiene principalmente receptores alfa adrenérgicos y el músculo detrusor principalmente beta adrenérgicos, aunque ambas regiones poseen los dos tipos de adreno-receptores.

I. 4. 2.- Cistorreceptores triptaminérgicos.

Aunque no hay muchos datos en la bibliografía, algunos autores han mencionado la presencia de receptores triptaminérgicos a nivel vesical.

GYERMEK en 1962, abordó el estudio de la acción de la serotonina ó 5 hidroxitriptamina (5HT) sobre la vejiga urinaria de perro. La administración intraarterial de 5HT, producía contracciones y aumentaba las respuestas de los estímulos eléctricos de la dimetifenilpiperacina, de la acetilcolina y también del cloruro potásico, pero esta contracción de la 5HT era muy resistente a los agentes bloqueantes o espasmolíticos.

Según este autor la acción estimulante de la 5HT tenía dos fases, una primera transitoria rápida y una segunda de mayor duración, bloqueándose la primera fase por morfina y cocaína y la segunda por LSD. Señaló además que la 5HT tendría más de un receptor en la vejiga, y que pequeñas dosis de ésta eran capaces de potenciar diferentes estímulos.

Es también de señalar que la acción de la acetilcolina y la estimulación de los nervios pélvicos se bloquean por el hexametonio y parcialmente por la atropina, pero ni el hexametonio ni la atropina son efectivos frente a los efectos de la 5HT.

Los resultados obtenidos por GYERMEK (1972) pueden interpretar

se de acuerdo con la teoría de GADDUM y PICARELLI (1957) que señalaron la presencia de dos tipos de receptores para la 5HT en el íleon de cobayo, un receptor D que era bloqueado por los antiserotonínicos como el LSD y por la dibencilina, y un receptor M que era bloqueado por la morfina y cocaína, pero no era alterado por el LSD.

Los receptores vesicales para la 5HT indicados por GYERMEK serían análogos a los señalados por estos autores. De esta forma la primera fase de acción de la 5HT, que es la fase rápida inicial, es la que sería bloqueada específicamente por morfina y cocaína, en cambio, los antiserotonínicos típicos actuarían sobre la segunda fase lenta. Esto es semejante a lo que sucede en el ganglio cervical superior, en el cual la acción de la 5HT es bloqueada por la morfina pero no por los bloqueantes ganglionares.

La potenciación que origina la 5HT sobre otros estímulos podría explicarse sobre la base de una facilitación de la transmisión ganglionar.

Posteriormente, SAUM et al. (1973) estudiaron la acción de la 5HT en la vejiga urinaria y en el ganglio vesical autónomo del gato, indicando que la 5HT podría tener dos tipos de acciones, una directa sobre el músculo y otra a través del sistema nervioso autónomo.

Ya que en la inervación vegetativa de la vejiga, el parasimpático representa seguramente la parte fundamental de la recepción de impulsos estimulantes, mientras que las fibras simpáticas serían en principio esencialmente inhibitorias, cabe pensar que la 5HT estimularía a ambos sistemas produciendo esa acción bifásica.

SAUM et al. (1973) han demostrado que la estimulación eléctrica de los nervios simpáticos de la vejiga produce dos respuestas inhibitorias distintas: a) depresión del músculo vesical antagonizada por los beta bloqueantes y b) depresión a nivel del ganglio que sería antagonizada por los bloqueantes alfa adrenérgicos.

Según los ensayos de SAUM et al. (1973) la administración intraarterial de la 5HT produce una contracción vesical que puede correlacionarse con la que se origina estimulando el ganglio vesical parasimpático, seguida de otra más prolongada que se debe a la acción estimulante directa sobre el músculo liso vesical. La contracción inicial es antagonizada por la picrotoxina y la secundaria por la metisergida. Además la 5HT deprime la descarga postganglionar desencadenada por la distensión de la vejiga ó por la administración de agentes anticolinesterásicos. Este efecto inhibitorio no fué antagonizado por los bloqueantes alfa ó beta, ni por la metisergida, la picrotoxina ó la morfina, sugiriendo que la 5HT tiene una acción depresora directa sobre las células ganglionares, semejante a la del tetraetilamonio.

En la figura nº 3 se especifican las acciones excitatorias e inhibitorias de la 5HT viéndose como en el efecto bifásico se produce, en primer lugar, un incremento de la presión intravesical, correlacionado con la fase excitatoria del ganglio antagonizada por la picrotoxina y, en segundo lugar, una respuesta más prolongada bloqueada por la metirsergida, presumiblemente debida a un estímulo directo del músculo vesical.

Estos hallazgos han tenido una confirmación real mediante los registro mecanográficos y los potenciales de acción. El efecto depresor de la 5HT se observaba a dosis extremadamente pequeñas, de una milésima de

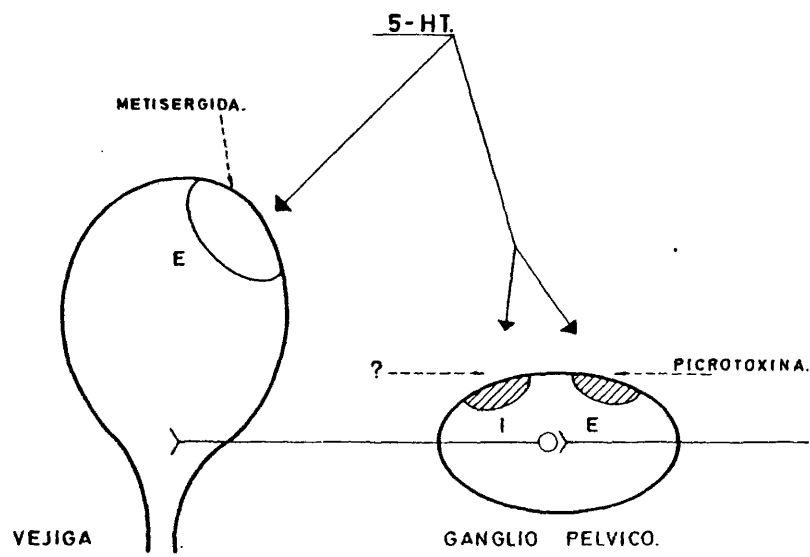


Figura : 3

de micra a una micra, dosis mayores originan más bien una facilitación se guida de depresión. Estas acciones no se realizarían por intermedio de un mecanismo adrenérgico, dado que las dosis de 5HT necesarias para produ cir la depresión son mucho más bajas que las necesarias para estimular la neurona adrenérgica, y por otro lado porque la administración de blo-
queantes alfa adrenérgicos no tienen acción alguna sobre la depresión pro ducida por la 5HT.

Por otra parte, parece que tampoco son exactamente iguales las respuestas originadas por el estímulo del ganglio pélvico parasimpático y del ganglio mesentérico inferior, en lo que concierne a la respuesta de la 5HT, ya que en el primero tiene un efecto depresor consistente y en el segundo sólo se observa este efecto depresor en un 50% de los ensayos.

El efecto excitatorio de la 5HT se evidencia en ambos ganglios pero es un componente más importante en el caso del ganglio mesentérico in ferior; hay que tener en cuenta además que en los primitivos estudios, la acción de la 5HT sobre el ganglio simpático superior se consideraba sola-
mente excitatoria y ahora se interpreta como una acción bifásica con otro
• componente inhibitorio.

Además de los hallazgos indicados, los experimentos de SAUM et al. (1973) proporcionan datos electrofisiológicos que confirman la acción inhibitoria de la 5HT en el ganglio parasimpático. Se concluye por lo tanto que la acción de la 5HT influye en la actividad de la vejiga actuando en diferentes lugares ó receptores triptaminérgicos: receptores excitato-
rios del músculo vesical y excitatorios e inhibidores del ganglio parasim-
pático.

I. 4. 3.- Cistorreceptores histaminérgicos.

Desde 1966 se conoce la existencia de dos tipos de receptores histaminérgicos diferentes, pero fué en 1972 cuando estos receptores se denominaron definitivamente H_1 y H_2 por BLACK et al. Dichos autores demostraron que estos dos grupos de receptores podrian distinguirse por medio de los compuestos: 4 metilhistamina y 2 metilhistamina.

Por otra parte, se sabe que la histamina produce contracción en la mayor parte de los músculos lisos de muchas especies de peces, de aves, de mamíferos; pero su acción varía mucho según la especie y el órgano.

Los músculos lisos de gato y de cobaya son particularmente sensibles, de forma que la gran sensibilidad del íleon aislado de cobayo se aprovecha para la dosificación biológica de la histamina. Ahora bien, en general para una especie dada el útero y los bronquios es lo más sensible; la vejiga, la vesícula biliar y el iris es lo más resistente, y entre estos extremos se encuentran el intestino y las arteriolas. La Vejiga es por tanto un órgano resistente a la histamina, pero en el que sin embargo se ha demostrado la presencia de receptores histaminérgicos.

FREDRICKS (1975) estudió la respuesta del músculo detrusor del conejo frente a la histamina a través de antagonistas farmacológicos. Los efectos espasmódicos de la histamina eran susceptibles al bloqueo muscarínico pero no al nicotínico; este hecho junto a la utilización de antagonistas selectivos de receptores H_1 y H_2 le permitió demostrar que la respuesta de la histamina era mediada por receptores H_1 , no encontrando-

se evidencia de la actividad H_2 .

Los datos acerca de estos receptores a nivel vesical son más bien escasos en la bibliografía actual.

1. 4. 4.- Terminaciones nerviosas purinérgicas.

En 1972 BURNSTOCK et al., corroborando los hallazgos de MANTEGAZZA y NAIMIZADA (1967), describieron en vejiga urinaria de cobayo, que las fibras excitatorias del nervio hipogástrico no eran adrenérgicas, presentando una marcada resistencia al bloqueo atropínico. Asimismo, dichos autores demostraron la presencia de fibras de naturaleza no colinérgica en los nervios pélvicos, cuya estimulación provoca una respuesta que no es inhibida por el bloqueo de receptores muscarínicos.

En diversos tipos de animales vertebrados se ha descrito la existencia de nervios no adrenérgicos ni colinérgicos en el control nervioso de la vejiga urinaria (BURNSTOCK et al., 1972). De igual modo, se han encontrado en otros órganos como en el caso del ileon y taenia coli de cobayo (ANADON, 1974).

CARPENTER y RAND (1965) trataron de elucidar el fenómeno de resistencia atropínica indicando que los receptores de acetilcolina en las uniones neuromusculares son inaccesibles a la atropina; HUKOVIC et al. (1965) propusieron que la atropina era desplazada de los receptores competitivamente por una elevada concentración local de acetilcolina.

Diversos autores (AMBACHE y ZAR, 1970; CUMSDAY, 1971; HENDERSON y ROEPKE, 1934), apoyan la teoría de que la mayor parte de los ner-

vios excitatorios que inervan la vejiga no son colinérgicos. Recientemente, BURNSTOCK et al. (1972) a la vista de que el ATP, y no la acetilcolina, mimetiza estrechamente la respuesta a la estimulación de nervios excitatorios no colinérgicos, han indicado que esta purina nucleótida es el transmisor liberado por estos nervios, proponiendo el término de nervios purinérgicos para los mismos.

ANADON (1974) ha dado un avance en el conocimiento de este sistema purinérgico. Dicho autor ha llevado a cabo un estudio sobre la farmacología evolutiva del sistema purinérgico, utilizando en el transcurso de sus investigaciones fibras lisas intestinales de cobayo neonatal y adulto (ileon y taenia coli), cronológicamente controladas, con objeto de realizar un estudio comparativo de los períodos de iniciación de respuestas, aparición de receptores y posibilidad de bloqueo de los mismos, para conocer así la cronofarmacología del sistema nervioso purinérgico.

Para ello ha empleado bloqueantes colinérgicos y alfabeta adrenérgicos, con el fin de anular completamente las posibles interacciones que pudieran surgir en las respuestas de la mayoría de las células de la fibra lisa, como consecuencia de la exploración nerviosa purinérgica.

De sus investigaciones, dicho autor ha indicado que el diferente comportamiento entre las fibras intestinales de los animales neonatales y adultos debería interpretarse como una evolución que se completa en los adultos y que está insuficientemente formada en los jóvenes.

En la misma línea de investigación ANADON et al. en 1975 han realizado un estudio con adenosina para conocer la cronofarmacología de la captación, biotransformación y liberación de ³H-adenosin en fibras li

sas de taenia coli e fleon de cobayo.

Anteriormente BURNSTOCK (1971) demostró por estudios de captación y liberación ^3H -adenosina en taenia coli que este compuesto, tras un proceso de difusión pasiva y por fosforilizaciones sucesivas, se transformaba en ATP, el cual se almacenaba en taenia coli y se liberaba en la activación de los nervios inhibitorios no adrenérgicos ni colinérgicos. ANADON et al. (1975) llegaron a conclusiones concordantes con este autor, observando además que la captación de ^3H - adenosina por fibras intestinales de fleon y taenia coli, sometidas a bloqueos coli - adrenérgicos, se encuentra reducida considerablemente en animales neonatales, y de forma poco significativa en los adultos; aunque en animales adultos los datos obtenidos son más ostensibles en fleon que en taenia coli. En cuanto a la liberación, la inhibición del sistema coli - adrenérgico, produce un incremento de ésta en términos generales, siendo mayor la liberación en las fibras correspondientes a los animales post - natales.

Por otra parte, ANADON (1976) ha estudiado el fenómeno denominado de "contracción de rebote", característico en la respuesta a la estimulación de los nervios purinérgicos y que está caracterizado por una contracción secundaria iniciada a nivel de la línea basal como respuesta a la estimulación transmural, en fibras intestinales de fleon de cobayos en edades controladas y sometidas a inhibición vegetativa. Los resultados obtenidos con fármacos potenciadores, inhibidores y bloqueantes de este fenómeno indican que la "contracción de rebote" se produce en fleon de cobayos adultos, no observándose dicho fenómeno en fibras neonatales de fleon ni en taenia coli de ambas edades.

Volviendo a la fibra vesical, BURNSTOCK et al. (1972) han de-

mostrado la participación de la purinas nucleótidas en la transmisión excitatoria en la vejiga, encontrando que los compuestos de purina con enlaces pirofosfato producen contracción vesical, siendo el ATP el más potente mientras que por otra parte el AMP y la adenosina originan relajación.

La respuesta excitatoria a la aplicación exógena del ATP posee un período latente y un tiempo de recorrido análogos a los de la contracción producida por la estimulación nerviosa, siendo en ambos casos una contracción rápida no mantenida (BURNSTOCK et al., 1972). Este hecho, también constatado por AMBACHE y ZAR (1970), está en contraposición con el comportamiento de la acetilcolina que causa una contracción prolongada del músculo después de un período latente más largo.

Como sucede en el intestino, la vejiga presenta una mayor sensibilidad al ATP, mientras que el ADP y el AMP parecen tener 1/10 y 1/200 de potencia respectivamente y el AMPc y el S-adenosimetionina son inactivos, (AMBACHE y ZAR, 1970). Sin embargo, así como el ATP y la adenosina tienen efectos diferentes en la vejiga de cobayo, en el intestino de los mamíferos ambos compuestos causan inhibición, siendo el efecto de la adenosina cien veces inferior (ANADON, 1974).

De otro lado, la evidencia de que los nervios purinérgicos inervan la vejiga se desprende de los ensayos en que las respuestas excitatorias de la vejiga de cobayo a la estimulación del nervio pélvico y al ATP fueron abolidas por la quinidina, sin que se bloquee la respuesta excitatoria a la aplicación de acetilcolina (BURNSTOCK et al, 1972).

Por otra parte, este autor también observó que el ATP a eleva-

das concentraciones producía taquifilaxia en la vejiga urinaria del cobayo, originando al mismo tiempo una reducción de las respuestas excitatorias a la estimulación de nervios no colinérgicos. El grado de esta reducción diferente en el íleon y la vejiga puede explicarse por las diferentes relaciones neuromusculares existentes en las dos preparaciones. La separación mínima entre el nervio y las membranas musculares en la capa longitudinal del intestino, raramente es inferior a 1000 \AA , mientras que en la vejiga hay varios contactos neuromusculares de 200 \AA .

La presencia de estas estrechas uniones neuromusculares en la vejiga puede justificar que la taquifilaxia al ATP se origine más fácilmente por las elevadas concentraciones de transmisor que se acumulan en la zona de unión después de su liberación por las terminaciones nerviosas. Por el contrario, los receptores purinérgicos pueden estar más ampliamente dispersados a lo largo de la membrana muscular en el intestino, donde el espacio sináptico es amplio, de manera que el transmisor liberado actúe sobre un área similar a la alcanzada por el ATP aplicado.

WEETMAN y TURNER (1974) contribuyeron a determinar la naturaleza purinérgica de estos nervios autónomos, estudiando los efectos de tres tipos de inhibidores de la biosíntesis del ATP sobre las contracciones hioscina - resistentes de la vejiga urinaria de cobayo producidas por la estimulación de dichos nervios.

Los compuestos estudiados fueron los inhibidores de la transferencia de energía, los inhibidores del transporte de fosfato mitocondrial y los agentes desacoplantes de la fosforilización oxidativa, siendo únicamente estos últimos los que bloquearon la respuesta a la estimulación ner

viosa más que la respuesta a la histamina. Este hallazgo por tanto corro
bora la naturaleza purinérgica de tales nervios.

I. 4. 5.- Receptores morfinicos y fibra lisa.

Se ha abordado recientemente el estudio de los receptores morfinicos en fibra lisa, así como las posibles interacciones de las aminas biógenas en la acción de la morfina a nivel de estos receptores.

KOSTERLITZ y WAAT (1968) han demostrado que la morfina reduce la amplitud de las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica en el plexo mesentérico de preparaciones de fibras longitudinales de fleón de cobayo, decreciendo la acetilcolina segregada por el fleón y actuando sobre distintos receptores que la noradrenalina.

WARD y TAKEMORI (1976 a) han llevado a cabo estudios sobre el desarrollo y pérdida de tolerancia a la morfina en el fleón de cobayo es timulado coaxialmente. El fleón de cobayo se hacía tolerante a la morfina por medio de la implantación de morfina "pellet" y utilizando naloxona como antagonista. se observaba que según se desarrollaba la tolerancia, la constante de afinidad del receptor para el antagonista (pA_2) de crecía, mientras que para los receptores analgésicos del sistema nervio so central la pA_2 aumentaba al incrementarse la tolerancia. Esto indica un cambio cualitativo más bien que cuantitativo a nivel de los receptores morfinicos.

Utilizando naloxona como antagonista a nivel de los receptores del fleón, los narcóticos, morfina, metadona, etorfina y levorfanol,

dieron valores más elevados de pA_2 que los antagonistas narcóticos, nalorfina, pentazocina y ciclazocina, habiéndose encontrado un resultado similar en los receptores analgésicos del sistema nervioso central. A la vista de ello, estos autores sugieren la existencia de dos tipos diferentes de receptores para las dos clases de compuestos o bien de lugares de acción diferentes sobre el mismo receptor. Sin embargo, aunque para los narcóticos, el antagonismo de la naloxona a nivel de la analgesia y de la inhibición de la contracción del ileon era competitivo, para los antagonistas narcóticos, el antagonismo de la naloxona era puramente competitivo tan sólo en el ileon. Por lo tanto, parece diferente la interacción de los antagonistas narcóticos, con los receptores del ileon y los receptores del sistema nervioso central.

Varios investigadores han sugerido que las aminas biógenas están involucradas en la acción de la morfina sobre el ileon de cobayo. En relación a esto, WARD y TAKEMORI (1976 b) observaron que la 5-hidroxidopamina (5HDA) producía una hipersensibilidad a la noradrenalina y decrecía los niveles de ésta en el ileon de cobayo. Por otra parte, la 6-hidroxidopamina (6HDA) no interfería con los efectos agudos de la morfina pero sí interfería con el grado de tolerancia desarrollado a ella. Estos resultados indican que los componentes adrenérgicos en el ileon no están involucrados en los efectos agudos de morfina, pero pueden estar implicados en los crónicos. Esto difiere de los efectos de la 6HDA sobre la respuesta analgésica de la morfina en la rata, ya que la 6HDA alteraba los efectos analgésicos agudos de la morfina pero no el desarrollo de tolerancia a ella, lo que indica una diferencia entre el receptor narcótico en el ileon y en el sistema nervioso central.

Otra amina biógena que ha recibido recientemente mucha atención, en lo que se refiere a su participación en la acción de la morfina, es la 5-hidroxitriptamina (5HT). Se ha determinado que en el cobayo morfino - tolerante, durante la abstinencia a la morfina se produce un incremento de la sensibilidad de los receptores serotonérgicos a la 5HT (WARD y TAKE-MORI, 1976 b).

Estos autores también han indicado que la 5HT no parece estar involucrada en la respuesta aguda a la morfina en el ileon de cobayo pretratado con 5, 6-dihidroxitriptamina (5,6DHT). Además no encontraron ninguna evidencia de que la 5, 6DHT alterara la respuesta aguda o crónica del ileon a la morfina. Esto está en contraposición con los resultados obtenidos para los receptores analgésicos, donde la 5, 6DHT inhibe el desarrollo de la tolerancia a la morfina. De este modo, el papel de las aminas biógenas sobre la acción de la morfina en el ileon parece ser diferente del registrado sobre la acción de la morfina a nivel del sistema nervioso central.

Como se puede observar, en la bibliografía consultada se recogen referencias acerca de la acción de la morfina a nivel intestinal, pero no se ha encontrado ninguna, con excepción de nuestros trabajos, sobre su acción y posible existencia de receptores morfínicos a nivel vesical.

En nuestro trabajo preliminar (IDDIPE, 1978) realizado en tiras vesicales sometidas a estimulación transmural, encontramos que la morfina en tyrode normal incrementa la motilidad espontánea de la fibra vesical, siendo este efecto mayor en la amplitud que en el ritmo, asimismo origina un aumento de la amplitud de las contracciones producidas por la estimulación. Por otra parte, cuando se utiliza tyrode guanetinizado e hiosciamina-

nizado la morfina no altera prácticamente la motilidad espontánea de la fibra vesical, aumentando algo menos la respuesta a la estimulación transmural que en tyrode normal.

Estos hechos no parecen estar de acuerdo con lo generalmente admitido de que la morfina más bien se comportaría como depresora de excitaciones en la vejiga, hecho que no puede ser generalizado. Se plantea el hecho de si este efecto es más o menos específico y si se puede admitir o no la existencia de un receptor opiáceo en la vejiga, ya que lo mismo sobre la respuesta a la estimulación transmural que sobre la motilidad espontánea, se produce siempre un estímulo.

Este efecto podría estudiarse a través del comportamiento de la morfina frente a un antagonista. En nuestro caso utilizamos la nalorfina, y a la vista de los resultados obtenidos pensamos que no es un antagonista completo de este supuesto receptor, de manera que a lo sumo sería un competitivo parcial. Por tanto el efecto que manifiestan estos fármacos en el intestino no se reproduce exactamente en la vejiga, y el supuesto receptor morfínico no tendría las mismas características que en la fibra intestinal.

I. 4. 6.- Receptores dopaminérgicos:

Los receptores de dopamina se han venido estudiando fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central, hay algunas indicaciones de la existencia de receptores dopaminérgicos en el intestino, de una manera análoga a como existen los receptores opiáceos del mismo, pero en la actualidad no tenemos una descripción muy sistemática de la existencia de receptores dopaminérgicos periféricos.

Revisando la bibliografía actual no hemos encontrado referencias acerca de estos receptores en vejiga urinaria de animales de experimentación o humana. Sin embargo, hay algunos trabajos de diversos autores que mediante diferentes técnicas han estudiado su presencia en determinadas zonas cerebrales e intestinales.

FERRI et al. (1977) han estudiado el efecto de la dopamina y la acción depresora de la morfina sobre el íleon de cobayo estimulado y han de mostrado que la potencia de la morfina reduciendo la amplitud de las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica en preparaciones longitudinales de íleon de cobayo, no es afectada por el pretratamiento con 6HDA. Asimismo han confirmado un efecto inhibitorio de la dopamina y la apomorfina a elevadas concentraciones y han demostrado que este efecto está presente y muy incrementado en preparaciones tratadas con 6HDA.

Los hallazgos de estos autores sugieren que la acción de la morfina no es mediada por la liberación de dopamina endógena en el intestino, sino que es más probable que la morfina y la dopamina, actúen sobre receptores separados e independientes unos de otros. En efecto, sólo un inhibidor específico de analgésicos, la naloxona, abolía la acción de la morfina sobre las contracciones, mientras que el bloqueo de los adrenorreceptores era ineficaz; contrariamente la acción inhibitoria de la dopamina parece mediada por la estimulación de adrenorreceptores alfa, ya que era inhibida por la fentolamina.

Estos hechos concordaban con los relatados por HEIMANS (1975), quien ha demostrado que el haloperidol, antagonista de receptores dopamínicos beta también en tejidos periféricos, no alteraba la acción de los

antagonistas narcóticos sobre el fleon. Por otra parte la dopamina y apo morfina pueden mimetizar los efectos de la morfina sobre preparaciones de fleon de cobayo sólo a concentraciones mucho más elevadas que las de la morfina. La dopamina a concentraciones inferiores que las que podrían ser normalmente inhibitorias, revierte parcialmente el efecto depresor de la morfina.

Este aparente antagonismo de la morfina por bajas concentraciones de dopamina y apomorfina, no se explica claramente. Sin embargo la dopamina administrada ventricularmente al cerebro tenía ambos efectos, "morfina like" y morfino - inhibitorios (FERRI et al. 1977).

Otros autores han abordado el estudio de los receptores dopaminérgicos mediante técnicas con utilización de radiofármacos. Estos métodos ofrecen las ventajas propias de los ensayos de radiorreceptores, que, debido a su sensibilidad y especificidad, están particularmente indicados para el estudio del mecanismo de acción de agentes psicótropos (BUARI, 1978).

Los receptores de fármacos psicótropos y antagonistas de dopamina, en particular, tienen muy intrigados a muchos científicos. Actualmente los antagonistas de receptores dopaminérgicos están siendo investigados en diferentes laboratorios de todo el mundo.

La disponibilidad de diferentes antagonistas y agonistas altamente marcados y de las técnicas más refinadas para la medida de la unión "in vitro" e "in vivo", ha permitido una identificación mas detallada de múltiples lugares de unión (LEYSEN y LAOURON 1978).

Van NUETEN, et al. (1978) estudiaron los efectos de la dopamina y secretina sobre la motilidad del estómago aislado de cobayo. Administrando 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de dopamina intraarterialmente, el estómago se relajaba, su actividad espontánea disminuía y su contenido aumentaba. Este efecto de la dopamina se inhibía selectivamente con antagonistas de dopamina como haloperidol (0,16 $\mu\text{g/ml}$) y domperidon (0,16 $\mu\text{g/ml}$). Estas observaciones demostraron la presencia de receptores dopaminérgicos en el estómago del cobayo. Con estudios de desplazamiento del ^3H -domperidon se llegaron a conclusiones similares en estómago de rata.

En efecto, la dopamina, importante neurotransmisor del sistema nervioso central, puede tener también un papel importante en lugares periféricos y se ha propuesto como posible neurotransmisor en la relajación gástrica en perros.

Estos hallazgos sugieren que la dopamina y la secretina están implicadas en el control local de la motilidad gástrica. Ponen en evidencia también que los efectos gastrocinéticos del domperidon puedan explicarse en parte por su interferencia con receptores dopaminérgicos en el estómago.

BURT et al. (1976 b) estudiando la acción del ^3H -haloperidol y ^3H -dopamina en membrana de cerebro de bovino demostraron la existencia de una interacción con receptores dopaminérgicos postsinápticos. Según estos autores las variaciones regionales observadas en la unión de ^3H -dopamina y ^3H -haloperidol son paralelas y se corresponden con las diferencias regionales de la innervación dopaminérgica. La potencia relativa de varios agonistas y antagonistas sobre la unión de los dos ligandos es paralela a

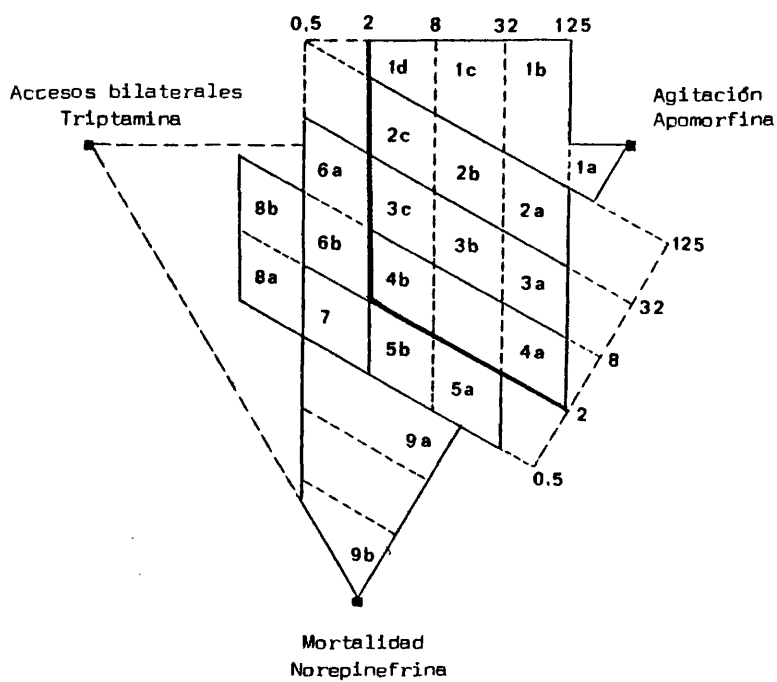
su acción farmacológica sobre los receptores dopaminérgicos. Los agonistas de dopamina tienen una afinidad 6 a 38 veces superior por los lugares de unión ^3H -dopamina que por los del ^3H -haloperidol. Por el contrario, los antagonistas de dopamina tienen de 20 a 12.000 veces más afinidad por los lugares de unión del ^3H -haloperidol que por los de la ^3H -dopamina. Derivados como la dietilamida del ácido lisérgico y otros antagonistas de la serotonina presentan una importante afinidad para ambos tipos de unión.

Por otra parte LEWI (1978) ha clasificado los antagonistas de dopamina a partir de datos farmacológicos, descubriendo un método gráfico que clasifica los antagonistas de dopamina sobre la base de tres observaciones farmacológicas. El llamado mapa espectral representa la afinidad relativa de estos agentes para tres modelos de receptores. Se ha designado el test A.T.N. para el estudio de las interacciones de los fármacos con apomorfina, agonista de receptores dopaminérgicos, con triptamina, que mimetiza a la 5 hidroxitriptamina y con norepinefrina.

Entre los diferentes efectos observados de apomorfina y triptamina en el test de A.T.N., se han elegido la agitación inducida por apomorfina y los accesos bilaterales inducidos por triptamina, ya que son los que se inhiben más sensiblemente por los antagonistas de dopamina. Su interacción con norepinefrina se representa por el antagonismo de la mortalidad inducida por norepinefrina. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se ha visto que los antagonistas de dopamina son también activos predominantemente como inhibidores de la agitación inducida por apomorfina en rata.

Entre los agentes estudiados por LEWI no hay evidencia de antagonistas típicos de triptamina. En resumen, este autor llegó a establecer una

clasificación empírica que comprende nueve clases principales de antagonistas de la dopamina y varias subclases. Los antagonistas de la dopamina pueden clasificarse manualmente por medio de un mapa espectral de sus afinidades relativas para tres receptores.



clopimozide	bronperidol	metoclopramida	spiperona
1a pimozide	haloperidol	1c sulpiride	fluspirotona
penfluridol	1b benperidol	1d benzoquinamida	
	moperona	butaclamol	
	trifluoperazina		
2a droperidol	perfenazina	2c pinoxepina	
	2b trifluoperidol		
	flufenazina		
3a tiotizena	trifluopromazina	3c clotiapina	
	homofenazina		
	3b etomoxano		
	fluanisona		
4a trietilperazina	clorpromazina		
	4b leuperone		
	flupentizol		
5a piprazetazina	5b promazina		
6a perlepina	6b octoclotepina		
7 azaperone			
8a pipamperone	8b clozapina		
9a tioridazina	9b azaperone		

Por otra parte, los ensayos realizados por BURKI (1978) con ratas pretratadas con haloperidol, clotiapina, loxapina, clorpromazina, tioridazina, N.T. 104 - 252 y clozapina o perlapina, le permitieron establecer correlaciones excelentes entre la inhibición de la unión específica del ^3H -haloperidol y el aumento de la concentración de DOPAC en el estriado inducido por los neurolépticos. Estos hallazgos confirmaron que el bloqueo de receptores dopaminérgicos provoca un aumento en el metabolismo de la dopamina. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna correlación con los cambios inducidos por los neurolépticos sobre la concentración de MOPEG - SO_4 en el tronco cerebral o de 5-HIAA en corteza, reafirmando que la inhibición de la unión específica del ^3H -haloperidol es debida solamente a los efectos de los fármacos sobre receptores dopaminérgicos.

Generalmente se ha aceptado que la unión no específica de los neurolépticos a preparaciones hícticas es no saturable, por lo menos en el rango de concentraciones estudiado. VARIMUZA et al. (1978) han observado que el análisis de Scatchard de la unión total de ^3H - haloperidol conduce a una curva bifásica. La porción vertical de esta curva se eliminaba por ebullición del tejido y era similar a la del análisis de Scatchard de la unión "estereoespecífica". Esto indicaba que la porción vertical representaba la unión específica, designada como saturable, mientras que la horizontal correspondía a la unión no específica o no saturable. Ello sugiere que solamente la unión específica podría ser afectada por la adición de un fármaco competitivo.

LEYSEN et al. (1978) desarrollaron un estudio sobre fijación a receptores neurolépticos con spiperona como ligando marcado. Dichos auto-

res observaron que en relación al haloperidol, la spiperona mostraba una constante de asociación del complejo ligando receptor 10 veces superior, lo que indicaba una mayor afinidad global para los lugares receptores que el haloperidol.

Los lugares receptores marcados por spiperona aparecían análogos a los del haloperidol, pero observándose pequeñas diferencias. El número de lugares receptores por gramo de tejido era mayor para la spiperona, que a su vez mostraba una curva de disociación ligando - receptor biológica que no se observaba con el haloperidol.

Estudios de inhibición utilizando agonistas y antagonistas revelaron que los lugares receptores marcados por ambos ligandos son principalmente de naturaleza dopaminérgica, sin embargo, también podía estar implicado un componente serotoninérgico y en menor proporción un componente noradrenérgico. Estos autores concluyeron que la spiperona resultaba ser un ligando más apropiado que el haloperidol para el estudio de receptores neurolépticos.

En esta misma línea de trabajo, LEYSEN y GOMMEREN (1978) estudiaron las diferentes propiedades cinéticas de la unión de receptores neurolépticos en estriado y corteza frontal de rata, encontrando que los lugares de unión estereoespecífica eran de diferente naturaleza en ambas regiones: dopaminérgica en el estriado y serotoninérgica en la corteza frontal.

Los experimentos de liberación llevados a cabo por dichos autores demuestran la presencia de efectos cooperativos positivos en la disociación de la spiperona de los receptores del estriado, mientras que en la

corteza frontal no se detectan. Se ha observado sin embargo en ambas regiones un componente de disociación rápido y otro más lento. De manera que en la corteza frontal el componente rápido se atribuye a la disociación de la spiperona de los lugares estereoespecíficos y el componente lento a la disociación de los lugares no estereoespecíficos. La naturaleza de estos lugares no se ha identificado todavía.

Los lugares de unión de la spiperona en el estriado son idénticos a los lugares estereoespecíficos marcados por el haloperidol y son dopaminérgicos. Los lugares de unión estereoespecífica de la spiperona en la corteza frontal son similares a los lugares marcados por ^3H -LSD y son serotoninérgicos, según afirman (LEYSEN y GOMMEREN, 1978).

Posteriormente, LEYSEN et al (1979) observaron que las áreas límbicas del cerebro presentaban múltiples lugares de unión para los neurolepticos, que a su vez se relacionaban con ambos mecanismos, dopaminérgico y serotoninérgico. Sin embargo, la importancia del bloqueo de ambos lugares en el tratamiento de la psicosis está todavía por estudiar.

En estas mismas fechas QUICK e IVERSEN (1979) determinaron la inhibición de la unión de ^3H -spiperona "in vitro" en homogeneizados de diferentes regiones del cerebro de rata por 2 amino - 6,7 - dihidroxitetralina (ADTN), un análogo rígido de dopamina, cinanserina, un bloqueante de 5 - hidroxitriptamina (5HT) y (+) butaclamol, un agente neuroleptico con gran afinidad para receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos. En estos estudios se observó que ADTN era un potente desplazante de ^3H -spiperona en el estriado, menos efectivo sobre el tubérculo olfatorio, sustancia nigra e hipotálamo, y desplazaba a la ^3H -spiperona del hipocampo,

y varias regiones corticales cerebrales solamente a concentraciones superiores a 10 μ M.

Los efectos regionales de la cinanserina sobre la inhibición de la unión de ^3H - spiperona eran esencialmente lo opuesto a los observados para ADTN. (+) - Butaclamol, por otra parte, desplazaba a ^3H - spiperona solamente algo menos intensamente en regiones con pobre inervación dopaminérgica o sin ella que en regiones con rica inervación. Utilizando ADTN y cinanserina conjuntamente para desplazar a ^3H - spiperona los resultados eran análogos a los observados con (+) - butaclamol o concentraciones altas de dopamina como desplazante, apoyando la hipótesis de que la ^3H - spiperona se une a ambos tipos de receptores, serotoninérgicos y dopaminérgicos.

La capacidad de la cinanserina para inhibir la unión de ^3H -spiperona en diferentes regiones del cerebro, está relativamente en buena correlación con las concentraciones de 5HT presentes en estas regiones, sin embargo la cinanserina no parece ser tan selectiva para los receptores serotoninérgicos como el ADTN lo es para los receptores dopaminérgicos.

Por otra parte, CRESE et al. (1977) CARSON et al. (1977), SEEMAN et al. (1975), SEEMAN et al. (1975) observaron que la ^3H -spiperona de alta afinidad específica, marca receptores dopaminérgicos en membranas de núcleo caudado y pituitaria anterior de bovino. La saturación y las propiedades cinéticas de la unión de la ^3H - spiperona son similares en los dos tejidos.

La ^3H -spiperona presenta en ambos tejidos una afinidad análoga y muy alta (EURT et al., 1976b), con una constante de disociación 0,2-0,3 nM.

La potencia relativa de numerosos agonistas y antagonistas de dopamina en competición por la unión de la ^3H -spiperona es también análoga en pituitaria anterior y caudado.

Con posterioridad CREESE et al. (1978) han confirmado que la ^3H -spiperona designa receptores dopaminérgicos en estriado de rata, BURT et al., 1975) sin embargo, en corteza frontal e hipocampo, designa receptores serotoninérgicos.

Los agonistas ^3H -ADTN y ^3H -apomorfina designan receptores dopaminérgicos en estriado de rata que comparándolo con la unión en estriado de bovino, revela una diferencia entre especies en la unión de ^3H -apomorfina.

Estudios de desplazamiento en rata sugieren que la ^3H -apomorfina clasifica dos tipos distintos de receptores dopaminérgicos, uno asociado con dopamina, sensible a adenilciclase y el otro con receptores dopaminérgicos presinápticos clasificados también por la ^3H -spiperona. Mientras que los cationes bivalentes aumentan la unión específica de ^3H -agonistas y ^3H -antagonistas a receptores dopaminérgicos, la unión de ^3H -agonista es disminuida selectivamente por algunos nucleótidos guanílicos.

Simultáneamente, BELD. et al. (1978) estudiaron la interacción de receptores dopaminérgicos determinando la inhibición concentración-dependiente de la unión de la ^3H -spiperona en homogeneizados de núcleo caudado de bovino con (+)-butaclamol, haloperidol, ergometrina, apomorfina y dopamina. Sobre la base de un criterio estadístico han llegado a postular un modelo con dos lugares de receptores independientes y no interconvertibles. Sin embargo no se ha llegado a establecer firmemente la

existencia de dos receptores dopaminérgicos funcionalmente y farmacológicamente distintos: receptores que median excitación (DAe-receptores) y receptores que median inhibición (DAi-receptores).

En este mismo tipo de preparados de núcleo caudado de bovino, HARTLEY y SEEMAN, (1978) observaron que cuando se aumentaban las concentraciones de ^3H - spiperona se requerían mayores concentraciones de spiperona para competir con el radioligando. Los resultados revelaron que la K_D (constante de disociación del radioligando) de la ^3H - spiperona, altamente liposoluble, variaba considerablemente dependiendo de que se refiriera a la concentración total o libre del isótopo.

En este mismo sentido también se han llevado a cabo experiencias "in vivo" por algunos grupos de investigadores. Así LADURON et al. (1978 a) estudiaron la distribución regional y el desplazamiento "in vivo" de agentes neurolépticos en cerebro de rata. En sus experiencias observaron que la ^3H - spiperona y el ^3H -pimozide presentaban una unión específica en las áreas dopaminérgicas del cerebro, hecho que se correlaciona con la distribución de receptores neurolépticos cuando se miden bajo condiciones "in vitro". Dosis elevadas de neurolépticos no marcados desplazaban solamente "in vivo" a los neurolépticos marcados en las áreas dopaminérgicas: estriado, núcleo caudado, tubérculo olfatorio y corteza frontal, pero no en el cerebelo.

Por otra parte, los agonistas dopaminérgicos desplazaban parcialmente a la spiperona marcada en el estriado, aportándose más datos que evidencian la naturaleza dopaminérgica del receptor neuroléptico. Sin embargo, los experimentos "in vivo" sugirieron que el receptor neuroléptico

no es el mismo en todas las áreas dopaminérgicas.

La mayoría de los ligandos, agonistas o antagonistas, son capaces de unirse a estructuras de membrana, tanto "in vitro" como "in vivo" y pueden seguirse diferentes criterios para identificar la unión específica del receptor.

La distribución regional puede proporcionar evidencias adicionales para demostrar las uniones específicas, especialmente en lo que concierne a experimentos de unión "in vivo".

Desde hace años se conoce la acción de los neurolepticos como bloqueantes de receptores dopaminérgicos.

Se han realizado experiencias de desplazamiento de ^3H - spiperona y ^3H -pimozide en diferentes regiones cerebrales con objeto de caracterizar los lugares de unión de agentes neurolepticos. Así, por ejemplo, los ensayos de unión de la spiperona han permitido identificar claramente receptores neurolepticos en la corteza frontal, hecho que aparece bastante compatible con la existencia de neuronas dopaminérgicas en esta parte del cerebro.

La diferencia entre los lugares de unión de las tres regiones corticales, frontal, parietal y occipital, es paralela al diferente contenido de dopamina observado en estas tres áreas. Sin embargo, tal paralelismo no es una regla general en todas las regiones del cerebro. El tubérculo olfatorio, por ejemplo, contiene mucha más dopamina que la corteza frontal o la sustancia negra mientras que el número de lugares de unión es similar. Esto apoya más la teoría de que el receptor neuroleptico

tico cuando se utiliza spiperona es relativamente homogéneo, es decir, no solo de tipo dopaminérgico sino también de tipo serotoninérgico, especialmente en la preparación de corteza frontal.

De estos resultados y de acuerdo con los de LEYSEN et al. (1978) se desprende que la spiperona parece ser el ligando más apropiado, quizá el ligando de elección, para revelar la presencia de receptores neurrolépticos, especialmente en las regiones del cerebro donde se hallan en escaso número.

Según los trabajos de LACURON et al. (1978 b), utilizando dosis elevadas de spiperona la distribución regional cambia radicalmente debido a la mayor contribución de la adsorción inespecífica que actúa como factor limitante. De hecho, al elevar la dosis, la unión no específica se incrementa tanto que enmascara a la unión específica que se satura muy rápidamente.

Concerniente al ensayo de unión a receptores "in vitro", la unión estereoespecífica o específica se detecta solamente si la concentración de ligando es suficientemente baja, alrededor de 10^{-9} M. A elevada concentración de ligando, por ejemplo 10^{-7} M, la unión no específica, debido a que no es saturable, se vuelve predominante, enmascarando así la específica. Por lo tanto, es de gran importancia utilizar dosis extremadamente bajas de fármacos con objeto de evaluar la unión específica "in vivo".

Además los resultados observados indican que la unión de la spiperona en cerebro de rata tiene lugar a nivel de receptores dopaminérgicos, confirmando así los resultados obtenidos bajo condiciones

"in vitro" así como también que la spiperona es el neuroléptico de elección para tales estudios "in vivo".

En experimentos posteriores LADURON et al. (1978 a) estudiaron la distribución subcelular de agentes neurolépticos y de sus receptores en diferentes áreas del cerebro de rata, utilizando como instrumento analítico el fraccionamiento histórico, e inyectando previamente los neurolépticos marcados a los animales. De esta manera determinaron también el esquema de distribución de diferentes enzimas marcadoras con el fin de evaluar la composición de las diferentes fracciones subcelulares. Se pudo observar que tras la inyección de ^3H -spiperona ó ^3H -pimozide se recuperaba específicamente la radiactividad en la fracción microsomal del estriado, tubérculo olfatorio, núcleo caudado y corteza frontal, pero no en el cerebelo. Después del equilibrio a través de un gradiente de sacarosa, el esquema de distribución de ^3H -spiperona revelaba un pico principal en la región del gradiente de baja densidad muy de acuerdo con el de $5'$ - nucleotidasa.

Estos resultados indican que los lugares receptores de los agentes neurolépticos en las áreas dopaminérgicas del cerebro están asociados con estructuras de membrana, pero no con mitocondrias ni con terminaciones nerviosas dopaminérgicas. Por tanto el receptor neuroléptico está asociado específicamente a estructuras de membrana contenidas en la fracción microsomal.

Recientemente SEEMAN et al. (1979) también han llevado a cabo estudios sobre receptores neurolépticos y concretamente sobre la estereoselectividad para enantiómeros neurolépticos. En sus ensayos han anali-

zando los efectos de ocho pares de enantiómeros neurolepticos sobre la unión específica de ^3H - spiperona al homogeneizado crudo de núcleo caudado de bovino, observando que el receptor neuroleptico es altamente estereoselectivo para los derivados rígidos del butaclamol y mucho menos para los neurolepticos flexibles. Es interesante el hecho observado de que la razón de estereoselectividad para isobutaclamol sobre el lugar ^3H -spiperona es de 146 mientras que es solamente de 7 para el lugar ^3H -apomorfina, indicando que los lugares de alta afinidad para los neurolepticos y la apomorfina pueden ser diferentes.

En estudios también recientes WHITAKER y SEEMAN (1979) han demostrado que existen por lo menos dos tipos de receptores dopaminérgicos, el receptor ^3H - dopamina o ^3H -apomorfina, con afinidad elevada o nM para dopamina, receptor posiblemente presináptico, y el receptor ^3H -neuroleptico, con afinidad baja o μM para dopamina, receptor probablemente postsináptico.

Posteriormente WHITAKER y SEEMAN (1979) observaron que en presencia de un exceso de fentolamina, serotonina y spiperona, concentraciones similares de agentes dopaminérgicos inhibían la unión de ^3H -LSD y ^3H -apomorfina al núcleo caudado de bovino. Todo ello es compatible con el concepto de que el receptor ^3H -apomorfina/dopamina y el receptor ^3H -neuroleptico/dopamina son entidades diferentes.

GOLDBERG et al. (1978) realizaron un estudio comparativo del receptor dopaminérgico vascular frente a otros receptores dopaminérgicos, encontrando que la apomorfina es activa sobre receptores dopaminérgicos vasculares, aunque mucho menos que la dopamina y se comporta como agonis

ta parcial. El 6 - N - n propilnorepomofina es más potente que la apomorfina y se comporta como agonista de receptores dopaminérgicos vasculares con una potencia tres a cinco veces inferior a la dopamina. La isoapomorfina sin embargo es inactiva como agonista vascular de dopamina.

El haloperidol se presenta como antagonista específico, pero su especificidad se encuentra limitada a un rango relativamente estrecho de concentración.

DAY y BLOWER (1975) encontraron que la administración intravenosa de metoclopramida antagonizaba la venodilatación renal inducida por dopamina. Asimismo, el bloqueo de receptores dopaminérgicos parece estar implicado en el efecto de la metoclopramida sobre el tracto gastrointestinal (BURY y MASHFOR, 1976; GUERRIN et al., 1967; HAY, 1977)

Se ha observado también que la apomorfina es algo más potente que la dopamina en el desplazamiento de ³H-dopamina, sin embargo en la producción de vasodilatación renal es un agonista parcial.

4606

MATERIAL Y METODOS

II. Material y Métodos.

II. 1.- Tipos de ensayos.

En este trabajo se han llevado a cabo los diferentes tipos de ensayos en vejiga urinaria de cobayo que vamos a referir a continuación.

II. 1. 1.- Estudio del comportamiento farmacológico vesical.

En primer lugar hemos estudiado el comportamiento espontáneo vesical así como la acción de distintos fármacos agonistas y antagonistas de receptores dopaminérgicos, en experiencias realizadas tanto "in-vitro" como "in vivo".

Los estudios realizados "in vitro" se ha llevado a cabo a su vez en distintos tipos de preparaciones: 1º) en tiras vesicales longitudinales, 2º) en tiras vesicales longitudinales previa denervación "in-vivo" ocho días antes, 3º) en vejiga completa y 4º) en vejiga completa con inervación hipogástrica.

En ellas se ha estudiado la acción de diferentes fármacos del tipo de dopamina, apomorfina y haloperidol y azaperone sobre la motilidad espontánea y sobre las respuestas a los estímulos trasmurales, coaxiales y de ambos nervios hipogástricos, para explorar así la presencia de dichos receptores, sus inhibidores e interacciones resultantes.

se han utilizado bloqueantes adrenérgicos y colinérgicos para evitar posibles interferencias de estos sistemas con las respuestas a ob-

tener y poder explorar la existencia de receptores específicos.

Por otra parte, se ha realizado también un estudio "in vivo" de la motilidad espontánea vesical así como de las respuestas frente a distintos fármacos.

II. 1. 2.- Captación de ^3H - dopamina "in vivo" e "in vitro".

En segundo lugar se ha llevado a cabo un estudio con ^3H - dopamina y diversos fármacos antagonistas de estos receptores que se han administrado "in vivo" con objeto de determinar la fijación de dopamina a las diferentes áreas vesicales y la inhibición del porcentaje de fijación por los diversos antagonistas.

Un tercer tipo de experiencias se han llevado a cabo en preparados de homogeneizados vesicales que se han sometido a incubación en presencia de ^3H - dopamina y diferentes agentes antagonistas con objeto de determinar si realmente existe una unión específica que nos demuestre la presencia de estos receptores.

II. 2.- Método de trabajo.

II. 2. 1.- Ensayos sobre el comportamiento espontáneo y respuestas a la estimulación vesical.

II. 2. 1. 1.- Preparación "in vitro".

Se procede al sacrificio del animal por conmoción y degüello, me

diante sección de las carótidas y yugulares, en la línea de conjunción formada entre las regiones cervical y cefálica. A continuación se fija el animal por sus extremidades a una placa de corcho e inmediatamente se secciona la piel, músculos abdominales y peritoneo, para dejar libre la cavidad abdominal; se retira el intestino hacia un lado, dejando a la vista la vejiga urinaria. Seguidamente se localizan ambos uréteres y se seccionan en el punto de entrada a la vejiga. A continuación el proceso se sigue de diferente manera según se vaya a trabajar a) con tiras vesicales, o b) con vejiga completa.

a) En las experiencias realizadas con tiras vesicales longitudinales, se procede seguidamente a la sección de la uretra a nivel del cuello vesical.

Una vez aislada la vejiga se sumerge en solución Tyrode oxigenada y a una temperatura de 34°C, procediéndose a la disección de la zona vesical a utilizar que se lleva a cabo por bisección de la vejiga por corte sagital de la misma (BURNSTOCK et al, 1972) obteniendo una tira que comprende fundus, zona media y cuello vesical.

Una vez aislada y limpia, la tira vesical se sitúa en un baño de órganos donde se sumerge en líquido nutritivo normal o bien guanetinizado e hiosciaminizado, según los ensayos a realizar, a temperatura constante de 34°C y aireados con carbógeno.

b) En las experiencias realizadas en vejiga completa se aíslan en su caso los nervios hipogástricos y a continuación se canula la vejiga con una cánula - electrodo, a través de un pequeño corte que se realiza en la parte anterior uretral y seguidamente se secciona la parte posterior ure

tral y se sitúa en el baño de órganos en las condiciones antes reseñadas.

El paso siguiente consiste en proceder al llenado de la vejiga a través de la cánula - electrodo, con líquido Tyrode.

En ambos casos, la tira ó la vejiga quedan suspendidas verticalmente de la palanca isométrica con una tensión de 1,5 gramos.

Se han realizado una serie de experiencias en tira vesical siguiendo también el proceso que acabamos de indicar pero con la variante de producir una denervación vesical hipogástrica ocho días antes de realizar los ensayos en el baño de órganos.

Para realizar esta denervación se anestesia el cobayo con etiluretano, al 15%, a la dosis de 1,5 g/kg, se fija el animal a una placa de corcho, y con material estéril y en condiciones asépticas se accede a la cavidad abdominal como indicamos anteriormente. Seguidamente se localizan ambos nervios y se seccionan en la zona distal vesical. A continuación se cose el peritoneo, músculos abdominales y piel.

El cobayo se mantiene aislado en una jaula durante ocho días, con administración diaria de Alphacilina Strepto 500.000 u. Al cabo de este tiempo se sacrifica el animal para obtener tiras vesicales y llevarlas al baño de órganos como hemos indicado anteriormente.

II. 2. 1. 2.- Preparación "in vivo".

Para el estudio de la motilidad vesical "in vivo" se procede a anestesiarse al cobayo con etiluretano al 15%, a la dosis de 1,5 g/kg, y se

sitúa sobre la mesa de trabajo.

Se procede a continuación a seccionar la piel y los músculos situados a nivel del cuello del cobayo, para canular seguidamente la tráquea y la yugular izquierda. La traqueotomía se lleva a cabo para favorecer la respiración del animal y la canulación de la yugular para administrar por esta vía los distintos fármacos a ensayar, dicha cánula se halla conectada a un depósito de Tyrode. A continuación se cose dejando a la vista ambas cánulas. Seguidamente se penetra en la cavidad abdominal llegando hasta la vejiga por el procedimiento antes indicado y se canula a través de un pequeño corte en la parte anterior uretral. La cánula y el conducto que la conecta hasta el aparato de registro (polígrafo GRASS) van llenos de Tyrode. Bien asegurada la canulación, se cierra la abertura peritoneal cosiendo peritoneo, músculo y piel, e inmediatamente se pone en marcha el registro de la presión interna vesical.

II. 2. 1. 3.- Baños de órganos y electrodos.

Se ha utilizado el baño de órganos clásico, con ciertas modificaciones realizadas por nosotros en lo que se refiere a la copa y electrodos.

Para las preparaciones de tiras vesicales y estimulación transmural la copa posee una capacidad de 25 cc y en ella se introducen dos electrodos de platino, aislados entre sí por sendos tubos de vidrio y colocados en otroexterno que nos transmiten la estimulación transmural y a su vez nos sirven de eje de montaje de las fibras correspondientes. (figura nº 4).

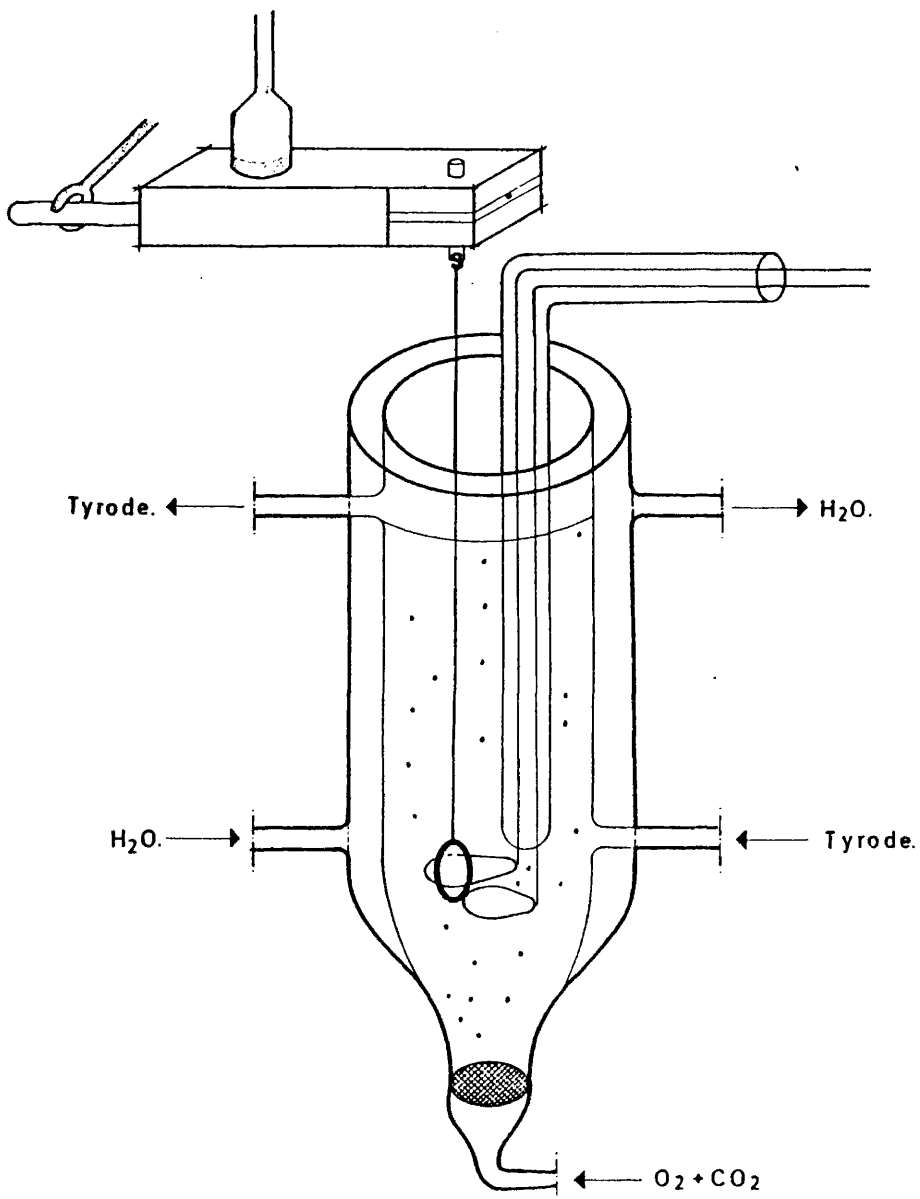


Figura: 4
Dispositivo para la estimulación transmural.

Para las preparaciones con vejiga completa y estimulación coaxial o a través de nervios hipogástricos, la copa tiene una capacidad de 75 cc y en este caso, como en el anterior, contiene solución Tyrode como líquido nutritivo. En esta copa se introduce la cánula electrodo utilizada para la estimulación coaxial o a través de nervios (figura nº 5) que sirve también como eje de montaje de la vejiga. Este dispositivo consta de una cánula de teflón que se ajusta verticalmente a un soporte y de dos electrodos; uno de ellos, aislado en un tubo de vidrio, recorre interiormente la cánula de teflón que sirve de soporte de la vejiga por la que se introduce el líquido nutritivo saliendo a su través al lumen vesical. El otro electrodo, suspendido del soporte, describe un anillo incompleto sobre el primero. Con esta técnica se logra obtener una estimulación coaxial uniforme de la vejiga, o bien una estimulación indirecta a través de los nervios hipogástricos, si, aislados éstos, se sitúan en contacto con el electrodo circular.

II. 2. 1. 4.- Estimulación eléctrica y registro.

El registro de las contracciones normales así como el de las respuestas a la estimulación se realiza por medio de un polígrafo GRASS mod. 79D que lleva adosado un transductor de tensión GRASS mod. FT03C y un transductor de presión STATHAN P23AC, que registra la presión interna vesical.

La aplicación de estímulos transmurales en el caso de las tiras longitudinales y de estímulos coaxiales o de nervios en el caso de las preparaciones con vejiga completa se lleva a cabo por medio de un estimulador GRASS mod. S09 y su transmisión tiene lugar por medio de electrodos

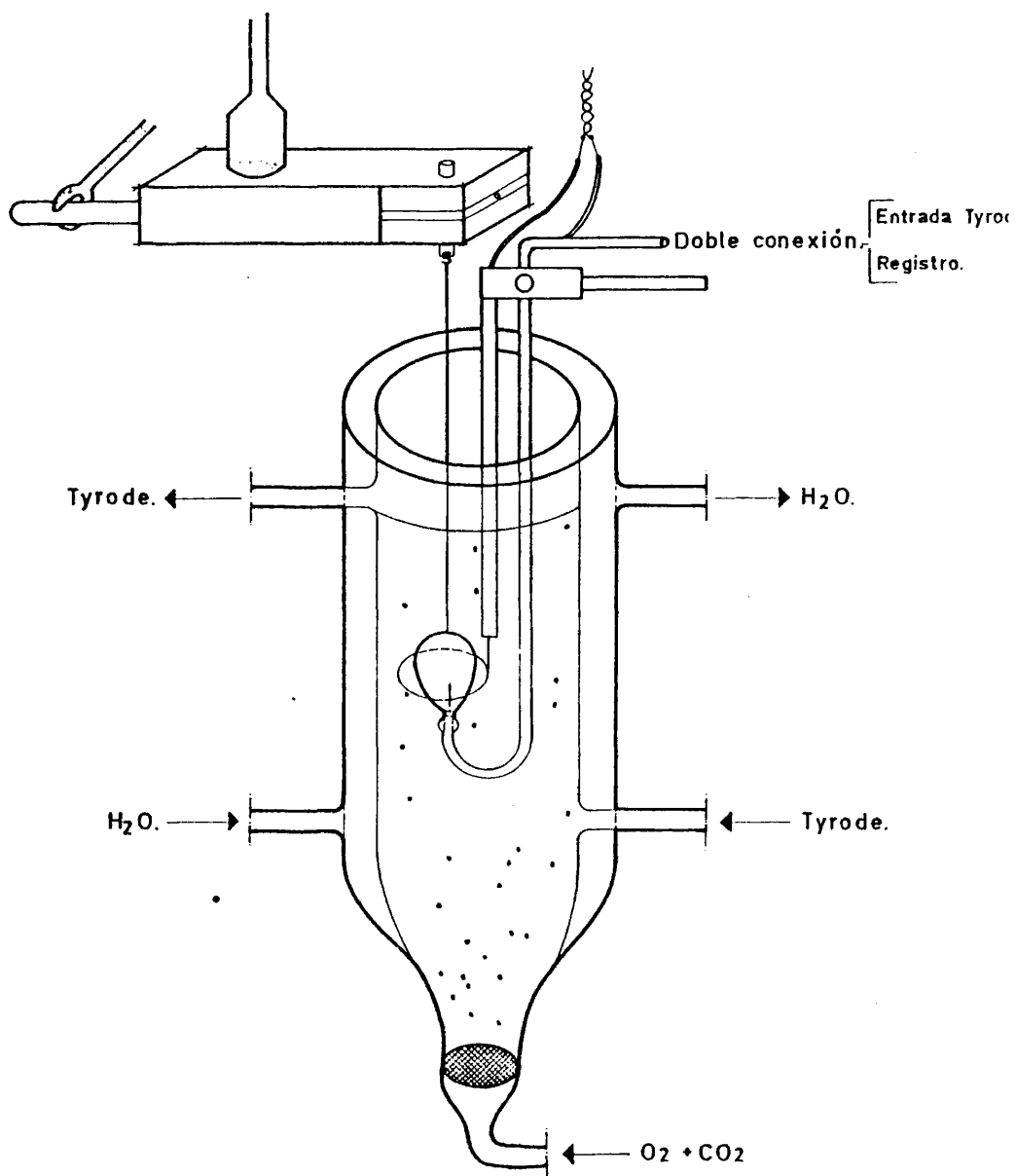


Figura: 5
Dispositivo para la estimulación coaxial.

de platino.

En ambos casos la preparación se somete a estímulos aplicados en forma de trenes o cadenas de pulsaciones de 5 segundos de duración, a intervalos de 3 minutos, que varían entre:

- estimulación transmural: 8 - 10 pulsaciones por segundo (pps), 2 milisegundos de duración (MSD), 70 - 100 voltios (V).
- estimulación coaxial: 8 - 10 pps, 2 MSD, 20 - 100 V
- estimulación a través de nervios hipogástricos: 8 - 10 pps, 2 MSD, 20 - 100 V.

Velocidad del papel de registro 2, 5 mm/min, a 5 mm/min.

Se ha trabajado con el amplificador a una sensibilidad 1 equivalente a un factor multiplicativo de 10, en la cual cada centímetro de amplitud corresponde a 1 g. de tensión.

II. 2. 2.- Ensayos sobre la captación de ^3H - dopamina.

Los estudios de fijación de la dopamina a la vejiga de cobayo se han realizado mediante técnicas analíticas cuantitativas de radiometría, determinándose la captación de ^3H - dopamina por dicho tejido tanto en forma aislada como en presencia de diferentes antagonistas. Para ello se han llevado a cabo dos tipos de ensayos, "in vivo" e "in vitro", que por su interés desarrollaremos separadamente. Se han utilizado en todos los casos cobayos hembras de peso aproximado 500 g.

II. 2. 2. 1.- Ensayos "in vivo".

Se procede a anestesiar el cobayo con etiluretano al 15% a la dosis de 1,5g/kg., situándolo a continuación en la mesa de experimentación. Se canula la vena yugular izquierda, inyectándose a través de ella una solución de ^3H - dopamina a la dosis de 10 mg/kg y 30 μCi /kg. (^3H - dopamina de actividad específica 4 Ci/m mol obtenida del Radiochemical Center Amersham, England).

Tras un periodo de 25 minutos se sacrifica el animal por conmoción y degüello y se aísla la vejiga, separándose inicialmente fundus, trigono y detrusor. Debido a que en los experimentos previos no se encontraba diferencia significativa entre la captación de las diferentes partes de la vejiga, se procedió en adelante a seccionar media vejiga y se refiere a ella los resultados obtenidos.

Las muestras del tejido, es decir, las hemivejigas, se pesan y se digieren en el vial de contaje con 0,5 ml. de hidróxido de hiamina en estufa a 60°C durante 24 horas.

Posteriormente se dejan enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 200 μl de peróxido de hidrógeno al 30% (v/v), manteniendo el vial durante 15 minutos a 60°C en estufa, para decolorar las muestras reduciendo así su extinción. Las muestras se enfrían de nuevo a temperatura ambiente y se les adicionan 200 μl de alcohol isopropílico y 10 μl de ácido acético, que neutraliza la basicidad de la solución, debida fundamentalmente al solubilizador (HELBURG, 1960), reduciéndose significativamente el tiempo necesario para la estabilización del fondo radiactivo (PENG, 1973).

A continuación se añaden 10 ml de líquido centelleador PCS (AMERSHAM), procediéndose a medir la radiactividad de las muestras así preparadas en un espectrómetro de centelleo líquido (INTEARTECHNIQUE).

Los viales utilizados para el conteo de la radiactividad contenida en las muestras son de borosilicato de bajo contenido en potasio, bajo fondo radiactivo, todos ellos iguales y de una capacidad de 20 ml.

Una vez preparados los viales, se introducen durante 2 horas en el espectrómetro de centelleo líquido con el fin de enfriarlos a 4°C, temperatura a la que se realiza el conteo y mantenerlos en la oscuridad un tiempo suficiente para evitar la quimioluminiscencia. El conteo se realiza de modo automático, con anchura de ventana programada para tritio (^3H), lectura en un solo canal, un solo conteo para cada vial y un funcionamiento automático de la fuente radiactiva para la realización de la tipificación por el método de relación de canales por estandarización externa, prefijándose un tiempo de conteo máximo de 10 minutos.

El espectrómetro de centelleo líquido registra las cuentas durante el tiempo fijado de 10 minutos por medida, permitiéndonos conocer el número de cuentas por minuto (C.p. m.) de cada muestra. A continuación de las cuentas, aparecen en el registro cuatro coeficientes que nosotros llamamos V_2 , V_1 , V_2' , V_1' , y que definen un factor de corrección Q , que mide el desplazamiento del espectro debido a la extinción y viene dado por:

$$Q = \frac{V_1 - V_1'}{V_2 - V_2'} \quad \text{para cada conteo.}$$

Seguidamente, conocido Q , mediante la curva de calibrado del tritio, en la que se representa el rendimiento de conteo frente al fac-

tor de corrección Q, se calcula el rendimiento (R) de cada medida. De este modo las desintegraciones por minuto vienen dadas por $\text{Dpm} = \text{Cpm}/R$ valor al que se precisa descontar el "fondo" correspondiente para obtener las Dpm reales para cada muestra, que finalmente se expresan por miligramo de tejido.

En lo que se refiere al estudio de la inhibición de la captación de ^3H - dopamina que producen diferentes antagonistas en la vejiga, se procede a administrar una solución de dichos antagonistas a la dosis de 0,1 mg/kg. por la vena yugular e inmediatamente la solución de ^3H - dopamina de 10 mg/kg, sacrificándose los animales a los 25 minutos y procediéndose a continuación del modo referido anteriormente. Los antagonistas utilizados para ello son: haloperidol, spiperona, domperidon, metoclopramida y F - 1943.

Se han realizado medidas por cuadruplicado para cada experiencia.

II. 2. 2. 2.- Ensayos "in vitro"

a) Preparación de homogeneizados.

Con objeto de obtener un homogeneizado simple de membranas se procede en primer lugar al sacrificio del cobayo, se aísla inmediatamente la vejiga y se pesa. Seguidamente el tejido se trocea finamente y se homogeneiza al 10% (LAI y CLARK, 1975) en un buffer tris - ClH, 50 mM, de pH = 7,7 conteniendo EGTA 0, 1 mM, pargilina 0, 02 mM y ácido ascórbico al 0,1% (BURKI, 1978), utilizando un homogeneizador de vidrio con pistilo de teflón Universal Laboratory Aid Type 309 y enfriado exteriormente con un baño

de hielo a 0°C. A continuación se centrifuga el homogeneizado a 0°C y 13000 rpm durante 20 minutos (OSBORN, 1978) en una centrifuga HERAENSCHRIST GMBH osterode Harz typ 5915 recogiendo el sobrenadante, fracción que contiene las membranas y que corresponde a la denominada S_2 de BLANCK y GILLIS (1979).

Una fracción del sobrenadante, 0,3 ml, se separa para llevar a cabo la determinación de proteínas que se realiza según el método de Biuret - Carafoli, frente a seroalbúmina como patrón, y el resto se divide en fracciones de 0,9 ml. que se destinan a preparar los diferentes medios de incubación.

b) Ensayos de unión.

Con el fin de determinar la fijación de 3H -dopamina en estas preparaciones de membrana de vejiga y evaluar la afinidad de dicha unión se adiciona 0,1 ml. de 3H -dopamina a las fracciones de 0,9 ml. de sobrenadante separadas anteriormente, resultando así concentraciones finales de 3H -dopamina de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , $2,5 \cdot 10^{-8}$, $7,5 \cdot 10^{-9}$, $2,5 \cdot 10^{-9}$, $1,25 \cdot 10^{-9}$, y $7,5 \cdot 10^{-10}$ M que se incuban a 37°C durante 15 minutos en un baño CIAT con agitación.

La concentración media de proteína en los medios de incubación es de 4,3 mg/ml.

La reacción se para por filtración rápida por succión con bomba de vacío, utilizando filtros Whatman GF/B que se lavan con 6 ml. de Buffer tris - ClH. 50 mM, pH = 7,7 a 0°C (BURKI, 1978; CREESE et al. 1978; HARLEY y SEEMAN, 1978). El tiempo de filtración y lavado no excedía en ningún caso

de 10 segundos.

Los filtros se sitúan en viales específicos de conteo, ya referidos en el apartado II. 2. 2. 2. a, a los que se adicionan 5 ml. de PCS, se introducen durante 12 horas en el espectrómetro de centelleo líquido con el fin de que se estabilicen a 4°C para que los filtros se vuelvan traslúcidos (VAFIMUZA et al., 1978). Al cabo de este tiempo se procede al conteo de las muestras (radiactividad fijada en los filtros), estableciendo las mismas condiciones referidas en el apartado anterior y determinando para cada caso Dpm. respectivas, que nos permiten evaluar los parámetros correspondientes de unión. En todos los ensayos se toma como blanco la cantidad de radioligando retenida en el filtro en ausencia de proteína.

Para estudiar el efecto que producen diferentes antagonistas sobre la unión "in vitro" de ^3H - dopamina en vejiga, se procede de igual modo con una concentración final de ^3H - dopamina de $2,5 \cdot 10^{-9}$ M. en los medios de incubación y adicionando previamente los diferentes antagonistas.

Las concentraciones finales alcanzadas en dichos medios son de $2,5 \cdot 10^{-8}$ a $1,6 \cdot 10^{-12}$ M para la spiperona, de $2,5 \cdot 10^{-6}$ a $2,5 \cdot 10^{-10}$ M para el domperidon y de $9,4 \cdot 10^{-5}$ a $9,4 \cdot 10^{-8}$ mg/ml para el F - 1943, procediéndose del mismo modo referido anteriormente.

Se han realizado medidas por cuadruplicado para cada experiencia.

II. 3. - Soluciones.

Tyrosde glucosado. - Líquido nutricio compuesto de:

Cloruro sódico (ClNa) MERCK, 136 mM.

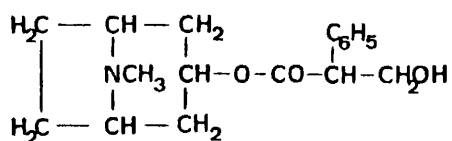
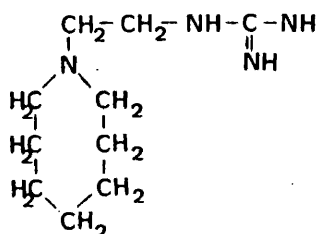
Cloruro cálcico (Cl_2Ca) MERCK 1,8 HM.

Cloruro magnésico (Cl_2Mg) MERCK, 1,04 mM.

Bicarbonato sódico (CO_3HNa) MERCK, 11,9 mM.

Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) 5,5 mM

Bifosfato sódico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$) MERCK, 0, 41 mM.



A dosis de $2 \cdot 10^{-7}$ M.

- Buffer Tris - ClH, 50 mM de pH = 7,7

Tris (hidroximetil) aminometano MERCK, 0,1 M

Acido clorhídrico (ClH) MERCK 0,1 M

De ambas soluciones se toman respectivamente 50 ml. y 36,6 ml. completando con agua destilada a 100 ml. para conseguir un pH = 7,7 y adi cionado:

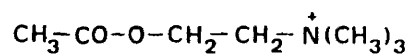
EGTA ($C_{14}H_{24}N_2O_{10}$) MERCK 0,1 mM.

Pargilina ($C_{11}H_{13}ClH$) SIGMA 0,02 mM

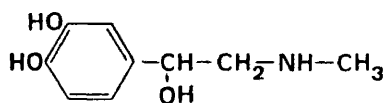
Acido ascórbico ($C_6H_8O_6$) MERCK 1%

II. 4.- Fármacos.

Acetilcolina (ROCHE) $C_7H_{16}NO_2$

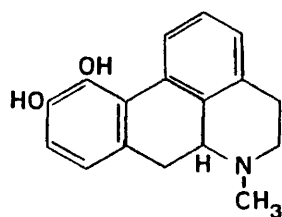


Adrenalina (J. NAVARRO) $C_9H_{12}NO_3$



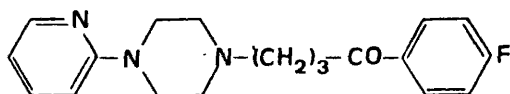
Se utiliza en forma de clorhidrato

Apomorfin (MERCK) $C_{17}H_{17}NO_2$

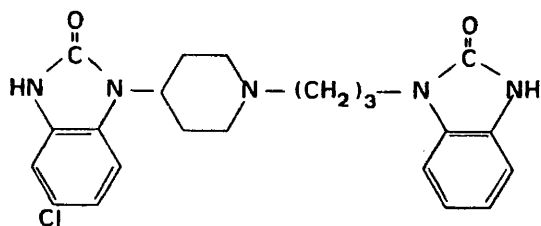


Se utiliza en forma de clorhidrato, en presencia de metabisulfito sódico como anti-oxidante.

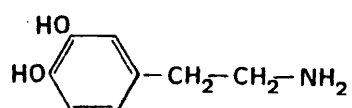
Azapiron (ESTEVE) $C_{19}H_{22}N_3O_3F$



Domperidon (ESTEVE) $C_{22}H_{24}N_5O_2Cl$



Dopamina (MERCK) $C_8H_{11}NO_2$



Se utiliza en forma de clorhidrato

3H - dopamina (AMERSHAM)

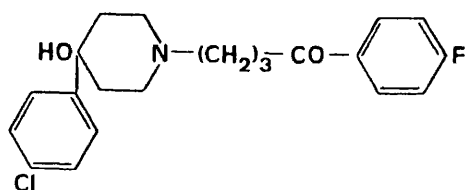
(3,4 - dihidroxil (anillo - G - 3H) feniletilamina hidrocloreto).

Actividad específica 4 Ci/m mol

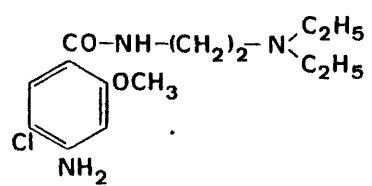
F - 1943 (DELAGRANGE),

Benzamida sustituida, compuesto de síntesis análogo a la metoclopramida.

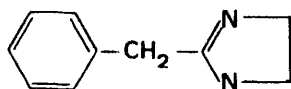
Haloperidol (LATINO) $C_{21}H_{23}NO_2FCl$



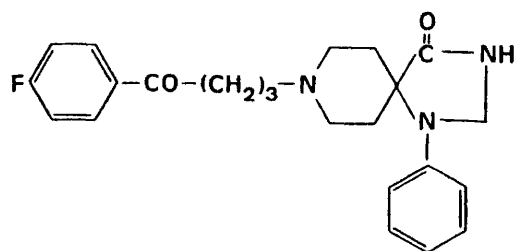
Metoclopramida (ALMIRALL) $C_{14}H_{22}N_3OCl$



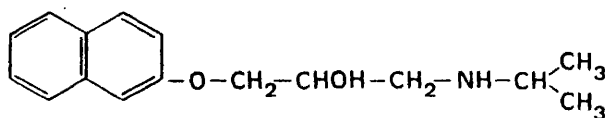
Priscol (CIBA) $C_{10}H_{12}N_2$



Spiperona (ESTEVE) $C_{23}H_{26}N_3O_2F$



Sumial (ICI - Farma) $C_{16}H_{21}NO_2$



Se utiliza en forma de clorhidrato

67612

2021

RESULTADOS

III. RESULTADOS.

Como ya se ha indicado anteriormente en el apartado II, se ha realizado una serie de ensayos sobre el comportamiento espontáneo y respuestas contráctiles a la estimulación eléctrica vesical y otra serie de ensayos sobre la captación de ^3H - dopamina, cuyos resultados se exponen separadamente a continuación.

III. 1.- Acción farmacológica sobre la motilidad espontánea y respuestas a la estimulación en diferentes preparados vesicales.

Se han llevado a cabo experiencias "in vivo" e "in vitro" en baño de órganos sobre preparados de tiras vesicales y vejigas completas de cobayo inervadas y denervadas, para el estudio de la motilidad espontánea de la fibra vesical, así como de las respuestas contráctiles originadas por la estimulación transmural, coaxial y a través de nervios hipogástricos. En estas preparaciones se ha estudiado la acción de diferentes fármacos agonistas y antagonistas de los supuestos receptores dopaminérgicos obteniendo los resultados que se indican a continuación.

Antes de entrar en ello hay que señalar que en el caso de las preparaciones de tira vesical hemos utilizado en nuestros estudios dos tipos de Tyrode, normal y con bloqueantes coliadrenérgicos. En ambos casos se puede observar el mismo comportamiento de la fibra en cuanto a motilidad espontánea y a contracción de respuesta a los estímulos transmurales.

El líquido nutricio con bloqueantes coliadrenérgicos se ha pre

parado en todas las experiencias utilizando la guanetidina a concentración de $7 \cdot 10^{-6}$ M, para conseguir un bloqueo neuronal, y la hiosciamina a $2 \cdot 10^{-7}$ M, ya que en un estudio inicial probando concentraciones crecientes de hiosciamina frente a concentraciones también crecientes de acetilcolina, se observó que esta concentración era suficiente como para conseguir un bloqueo de la acción de la acetilcolina aplicada exógenamente a concentraciones elevadas.

Se ha observado que la adrenalina disminuye la amplitud y ritmo de las contracciones espontáneas, efecto que es proporcional a la dosis utilizada, de forma que a concentraciones de 10^{-4} M prácticamente desaparece la motilidad espontánea de la fibra. Un hecho similar ocurre con la respuesta a la estimulación transmural, donde la adrenalina produce un efecto depresivo sobre la amplitud de la respuesta. Sin embargo en presencia de guanetidina se soslayan las posibles interferencias que podrían ocasionar los efectos de la liberación de adrenalina.

Se ha observado también que la acetilcolina produce una inmediata modificación de la motilidad espontánea, de magnitud proporcional a las dosis empleadas y claramente ostensible a concentraciones elevadas de $2 \cdot 10^{-4}$ M; sin embargo se ha encontrado que una concentración de hiosciamina de $2 \cdot 10^{-7}$ M en el líquido nutritivo, es suficiente como para proporcionar un bloqueo prácticamente total de la acetilcolina a estas concentraciones (figura nº 6).

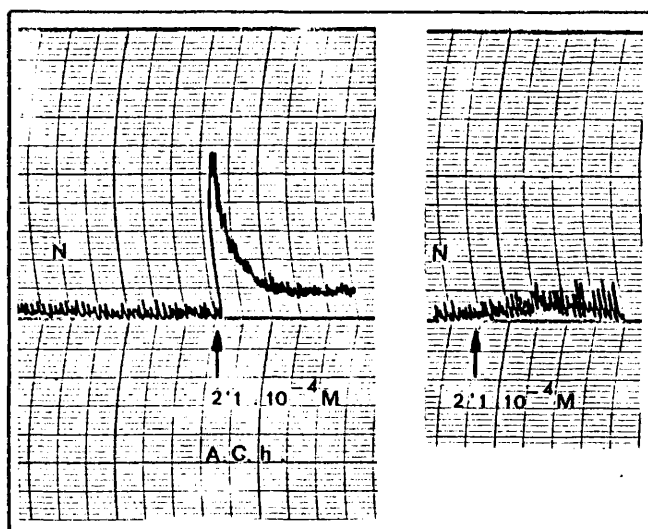


Figura nº 6.- Tira vesical. Contracción normal (N); aplicación de acetilcolina $2,1 \cdot 10^{-4}$ M y $2,1 \cdot 10^{-4}$ M respectivamente. Tyrode normal y Tyrode guanetizado e hiosciaminizado respectivamente; v.p. 2,5 mm/min.

III. 1. 1.- Dopamina

III. 1. 1. 1.- Acción sobre la motilidad espontánea vesical.

a) En tiras vesicales:

Tanto en tyrode normal como en tyrode con bloqueantes se observa que produce un ligero efecto depresivo a bajas concentraciones para pasar a un efecto estimulante a concentraciones superiores del orden de $2 \cdot 10^{-4}$ M y muy ostensible a concentraciones de 10^{-3} M. (figura nº 7).

b) En tiras vesicales ocho días después de la denervación:

Se ha encontrado un efecto estimulante a concentraciones análogas a las del caso anterior (figura nº 8).

c) En vejiga completa:

Se observan los efectos de manera quizá más ostensible que en las tiras vesicales. Se encuentra un efecto estimulante sobre la amplitud de la motilidad espontánea, observado ya para concentraciones de 10^{-5} M, inferiores por lo tanto a las que producen este mismo efecto en las tiras vesicales. Se observa este mismo aumento en los registros de vejiga completa con estimulación coaxial.

d) In vivo:

Tras la administración de dopamina por vía intravenosa (0,7 mg/100 g. peso de cobayo) se observa un claro efecto estimulante sobre la motilidad de la fibra vesical con un aumento de la amplitud y ritmo de las contracciones, acorde con los resultados obtenidos "in vitro" (figura nº 9)

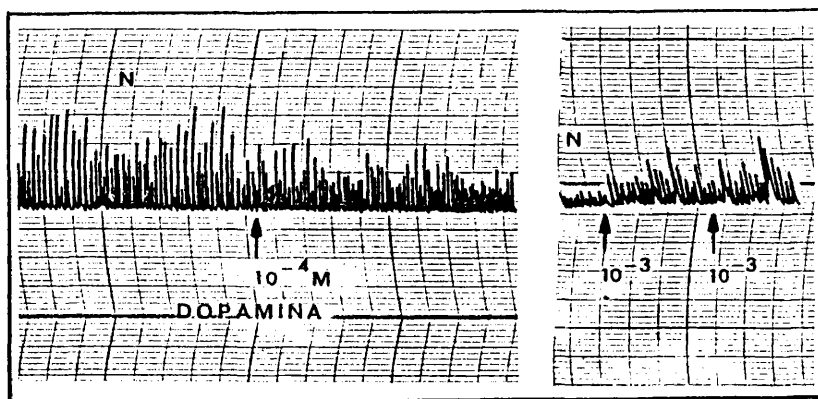


Figura nº 7.- Tira vesical. Contracción normal (N), aplicación de dopamina 10^{-4} M, 10^{-3} M y 10^{-3} M respectivamente. Tyrode gunetizado e hiosciaminizado; v.p. 2,5 mm/min.

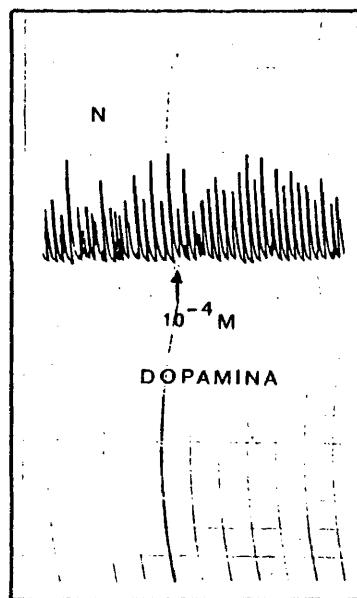


Figura nº 8.- Tira vesical denervada. Contracción normal (N); aplicación de dopamina 10^{-4} M. Tyrode normal; v.p. 2,5 mm/min.

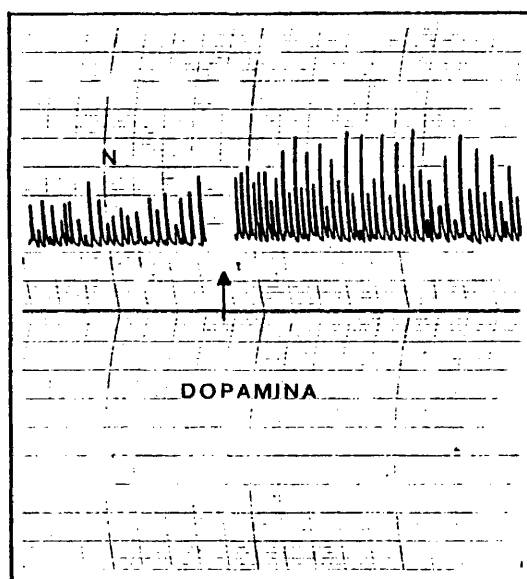


Figura nº 9.- Registro "in vivo". Contracción normal (N); administración de dopamina 0,7 mg/100 g. peso de cobayo. Registro de presión intravesical; v.p. 2,5 mm/min.

III. 1. 1. 2.- Acción de la dopamina sobre las respuestas a la estimulación eléctrica.

a) Estimulación transmural en tira vesical:

En Tyrode normal así como en Tyrode con bloqueantes produce inhibición dosis - dependiente de las respuestas contráctiles, que oscila desde una ligera inhibición para dosis de $10^{-6}M$ y $10^{-5}M$ a otra más ostensible para dosis de $10^{-4}M$ y $10^{-3}M$.

La acción del haloperidol se ha estudiado aisladamente, como veremos en el apartado III, 1. 3; observando que produce una disminución de las contracciones de respuesta a la estimulación transmural y que tiende a aumentar la motilidad espontánea. Ambos efectos se producen con mayor intensidad que con la dopamina para concentraciones análogas.

Cuando el haloperidol se aplica previamente a la dopamina origina una disminución de las contracciones de respuestas a la estimulación, disminución que es incrementada por la posterior aplicación de dopamina, al mismo tiempo que ésta según la dosis, disminuye ligeramente la motilidad espontánea (Figura nº 10).

Cuando se aplica el haloperidol con posterioridad a la dopamina incrementa, asimismo, la disminución de las contracciones de respuesta a la estimulación producida por la dopamina, al mismo tiempo que aumenta la motilidad espontánea que había sido disminuida por la dopamina (figura nº 11).

Estos efectos se observan de manera análoga en Tyrode con bloqueantes, tanto al aplicar conjuntamente estos fármacos como al hacerlo separadamente:

- b) Estimulación transmural en tira vesical ocho días después de la denervación.

Se observa, como en el caso anterior, una disminución de la amplitud de las contracciones producidas como consecuencia de la estimulación transmural, disminución cuantitativamente algo menor que la mostrada en tiras procedentes de animales que no habían sido sometidos a previa denervación (figura nº 12). También puede observarse el correspondiente aumento de la motilidad espontánea.

- c) Estimulación coaxial en vejiga completa.

Se observa un efecto depresivo sobre las contracciones de respuesta a los estímulos coaxiales, que se presenta con claridad para concentraciones de $2 \cdot 10^{-5}$ M y superiores a ésta. Paralelamente tiene lugar un incremento de la motilidad espontánea vesical, tanto en lo que se refiere a su frecuencia como a la amplitud de sus contracciones (figura nº 13). Estos efectos quedan reflejados en las figuras tanto en el registro de tensión isométrica como en el de la presión intravesical.

- d) Vejiga completa. Estimulación a través de ambos nervios hipogástricos:

Con este tipo de estimulación los efectos de la dopamina son tan claros como en los casos anteriores, aunque en este caso es necesario para ello elevar la dosis. Aparece una disminución de las respuestas

contractiles, tan intensa a dosis de 10^{-3} M, que las respuestas llegan a confundirse con las correspondientes a la motilidad espontánea, hecho que ya sucedía con el haloperidol en las tiras vesicales (figura nº 14).

También se han aplicado conjuntamente ambos fármacos, haloperidol y dopamina, produciéndose efectos análogos a los mencionados anteriormente.

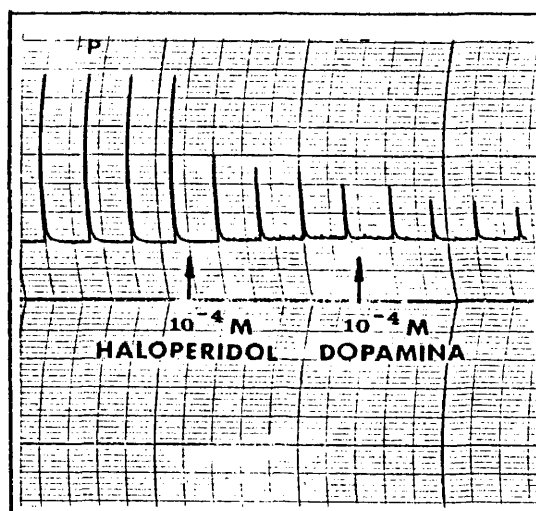


Figura nº 10.- Tira vesical. Estímulos transmurales patrón (P); aplicación de haloperidol 10^{-4} M y de dopamina 10^{-4} M y estímulos transmurales subsiguientes. Tyrode normal, condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 100, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

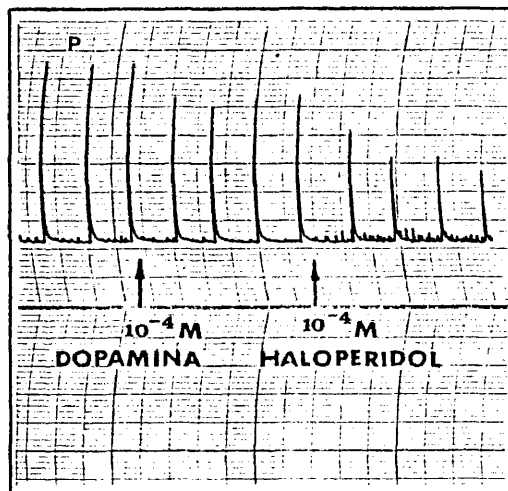


Figura nº 11.- Tira vesical. Estímulos transmurales patrón (P); aplicación de dopamina $10^{-4} M$ y haloperidol $10^{-4} M$ y estímulos transmurales subsiguientes. Tyrode normal, condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 100, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

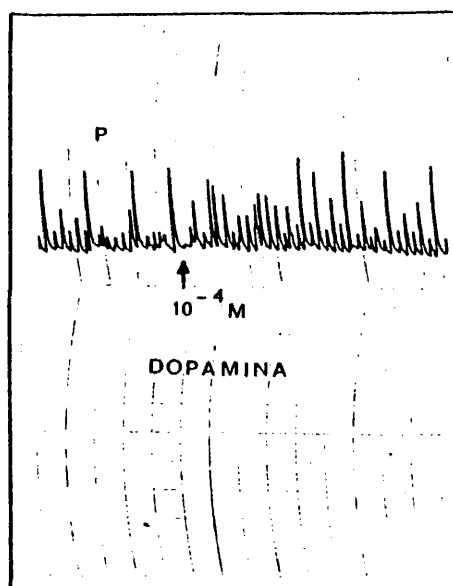


Figura nº 12.- Tira vesical denervada. Estímulos transmureles patrón (P); aplicación de dopamina 10^{-4} M y estímulos transmureles subsiguientes. Tyrode normal, condiciones de estímulos (fr. 10, MS. 2, vol. 90, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

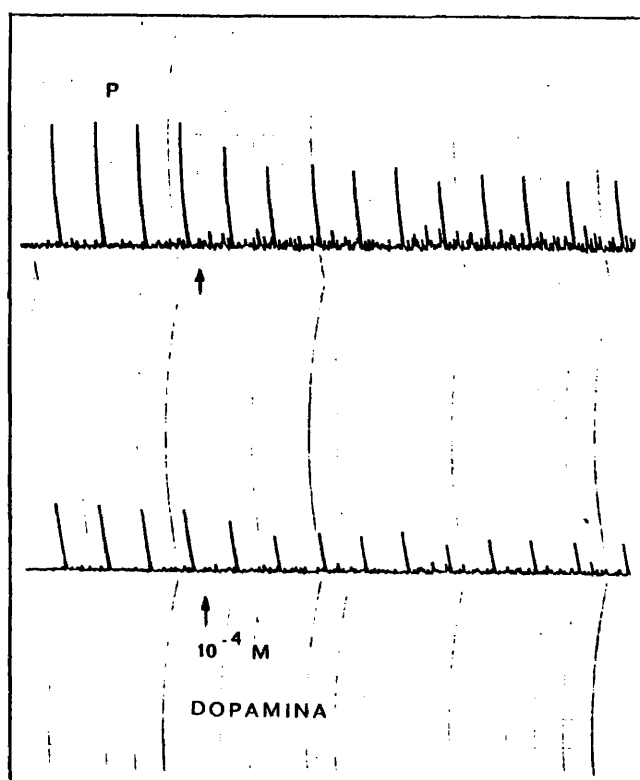


Figura nº 13.- Vejiga completa. Registro superior; tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos coaxiales patrón (P); aplicación de dopamina 10^{-4} M y estímulos coaxiales subsiguientes. Tyrode normal, condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol, 95, dur, 5 sg); v.p. 25, mm/min.

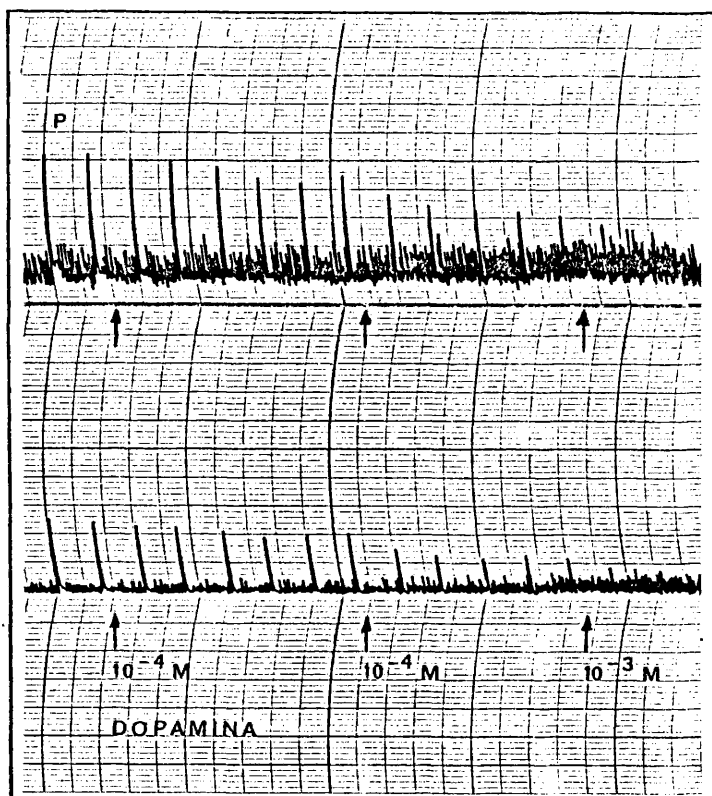


Figura nº 14.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de dopamina 10^{-4} M, 10^{-4} M y 10^{-3} M respectivamente y estímulos subsiguientes. Tyrode normal, cordiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 100, dur. 5sg); v.p. 2,5 mm/min.

III. 1. 2.- Apomorfina.

III. 1. 2. 1.- Acción sobre la motilidad espontánea vesical.

a) En tiras vesicales:

Se ha observado un aumento de la amplitud de la contracción espontánea con dosis de 10^{-5} M, efecto que se hace más ostensible si se aplica a dosis acumulativas mayores, dosis a las que también se produce un incremento del tono y del ritmo. Este efecto se pone de manifiesto cuando se trabaja tanto con tiras sumergidas en Tyrode normal como en Tyrode con bloqueantes (figuras nºs 15 y 16).

b) En tiras vesicales ocho días después de la denervación:

Se produce un efecto estimulante a concentraciones análogas a las referidas en el caso anterior, observable también en los registros con estimulación.

c) En vejiga completa:

En estos preparados, llevando a cabo un registro tanto de tensión isométrica a través del hilo del que suspende la vejiga, así como de la presión interna vesical, se puede observar el aumento de la motilidades espontánea, en lo que se refiere a la amplitud y tono de las contracciones, aumento originado por la apomorfina desde concentraciones de 10^{-5} M, (figura nº 17).

Este efecto se ha comprobado también aplicando previamente haloperidol, o bien fármacos como Prisol (tolazolina) y Sumial, bloqueantes

respectivamente de los receptores alfa y beta adrenérgicos (figura nºs. 18 y 19).

d) In vivo:

Los hallazgos que acabamos de indicar se han corroborado "in vi vo" mediante la administración intravenosa de apomorfina a dosis crecientes partiendo de 0,014 mg/100 g peso de cobayo. El efecto estimulante de la motilidad espontánea producido por la apomorfina es a su vez incrementado al aplicar con posterioredad haloperidol (0,007 mg/100g), disminuyendo el ritmo de las contracciones (figura nº 20).

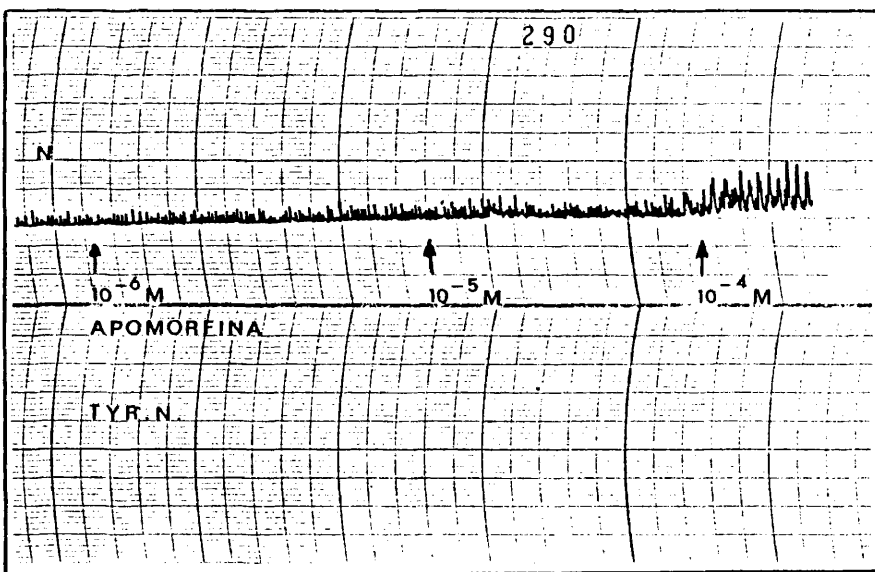


Figura nº 15.- Tira vesical. Contracción normal (N); aplicación de apomorfinas $10^{-6} M$, $10^{-5} M$ y $10^{-4} M$ respectivamente. Tyrode normal; v.p: 2,5 mm/min.

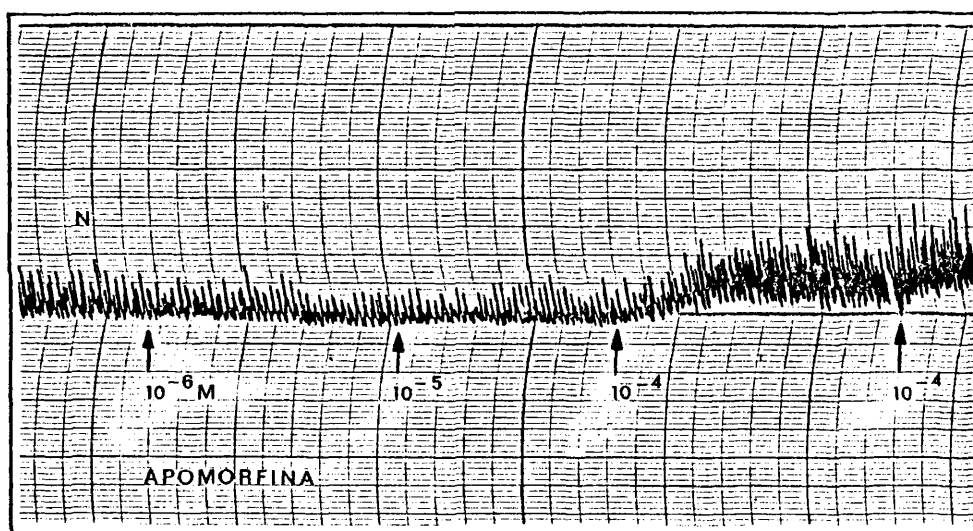


Figura nº 16.- Tira vesical. Contracción normal (N); aplicación de apomorfina 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M y 10^{-4} M respectivamente. Tyrode guanetinizado e hiosciaminizado; v.p. 2,5 mm/min.

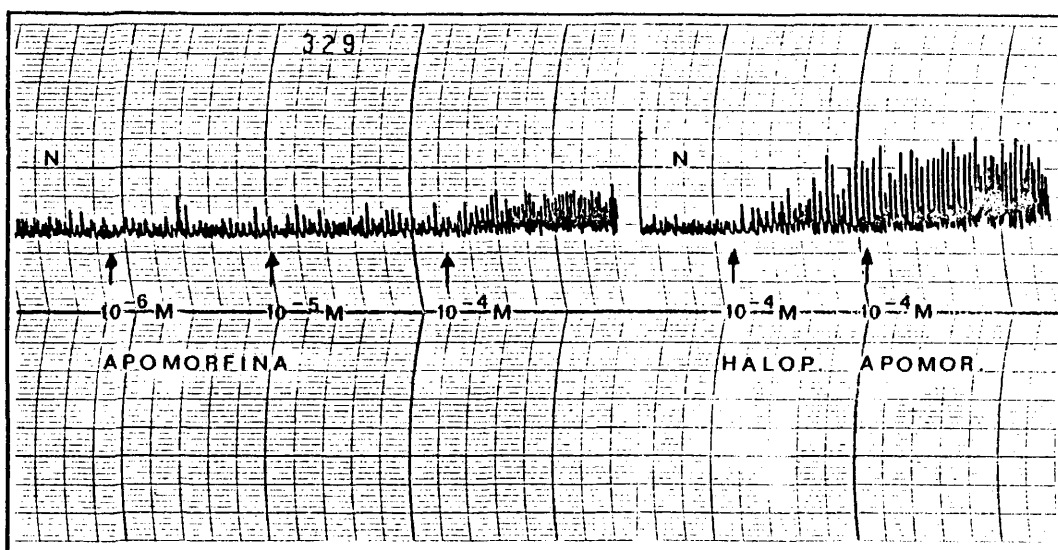


Figura nº 17.- Vejiga completa. Registro de tensión isométrica. Con tracción normal (N); aplicación de apomorfinina 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M, de haloperidol 10^{-4} M y de apomorfinina 10^{-4} M respectivamente. Tyrode normal; v.p. 2,5 mm/min.

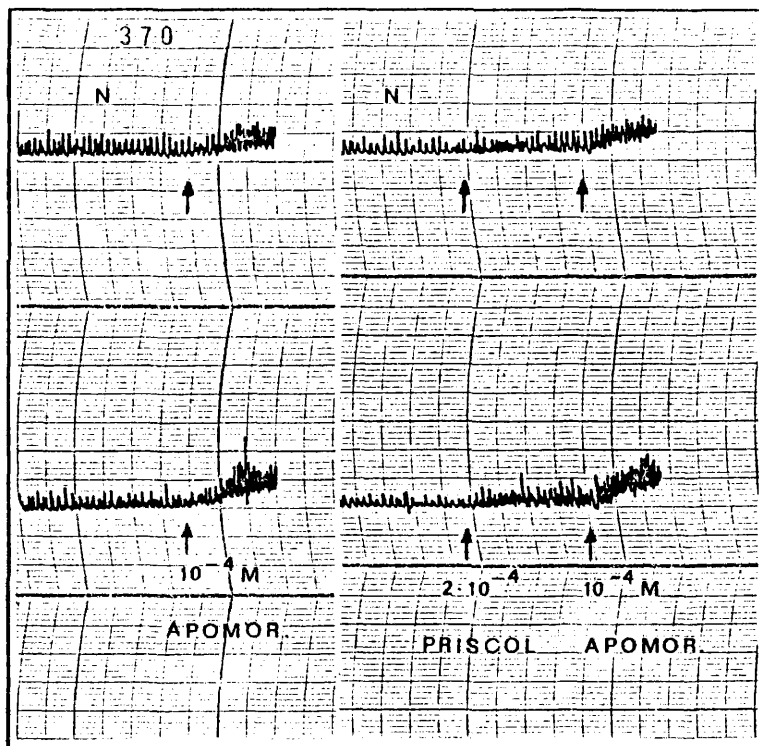


Figura nº 18.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Contracción normal (N); aplicación de apomorfina 10^{-4} M, de Priscol $2 \cdot 10^{-4}$ M y de apomorfina 10^{-4} M respectivamente. Tyrode normal; v.p. 2,5 mm/min.

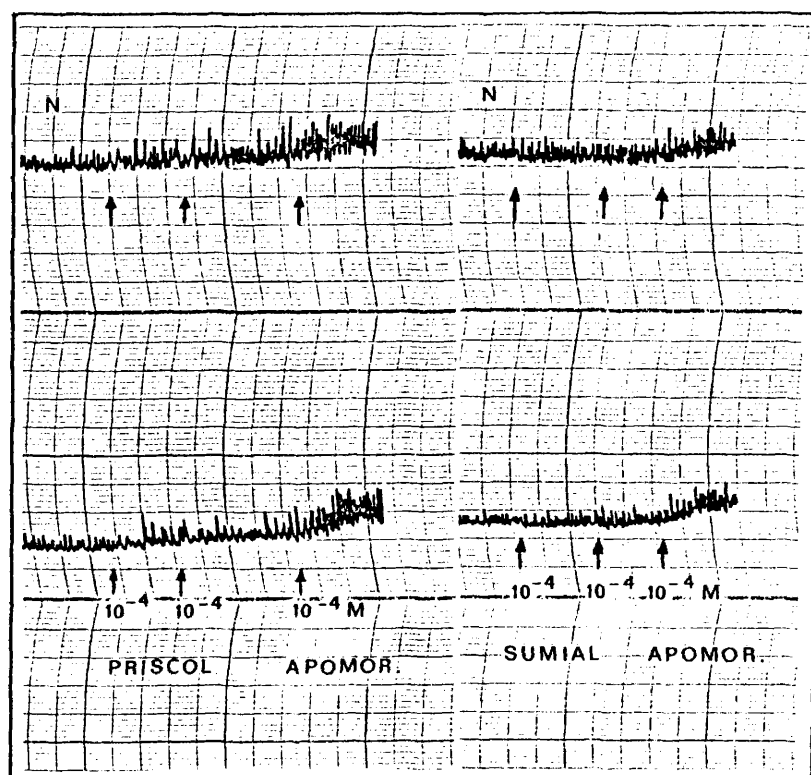


Figura nº 19.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Contracción normal (N); aplicación de Priscol 10^{-4} M y 10^{-4} M, de apomorfinina 10^{-4} M, de Sumial 10^{-4} M y 10^{-4} M y de apomorfinina 10^{-4} M respectivamente. Tyrode normal; v. p. 2,5 mm/min.

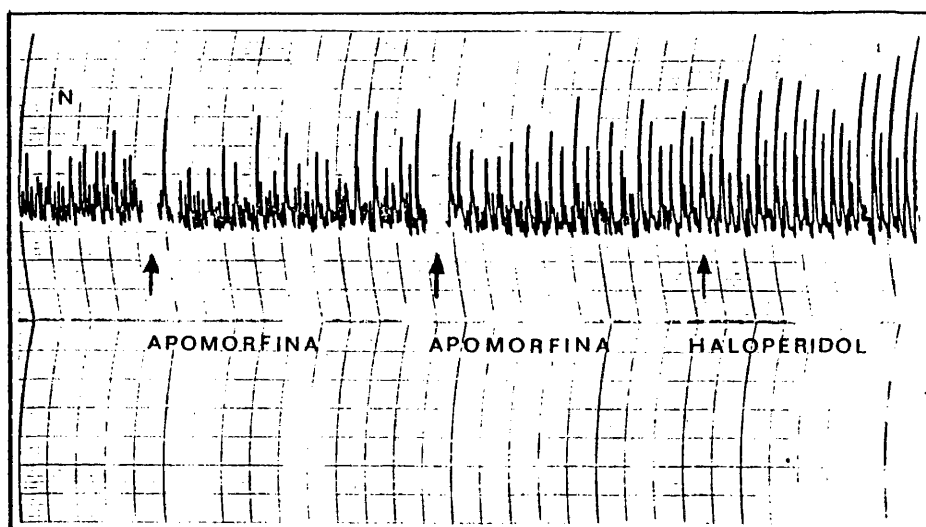


Figura nº 20.- Registro "in vivo". Contracción normal (N); administración de apomorfina 0,014 mg/100 g peso de cobayo y 0,056 mg/100 g y de haloperidol 0,0071 mg/100 g, respectivamente. Registro de presión intravesical; v. p. 2,5 mm/min.

III. 1. 2. 2.- Acción de la apomorfina sobre las respuestas a la estimulación eléctrica.

a) Estimulación transmural en tira vesical.

A este nivel la apomorfina produce una disminución de la amplitud de las respuestas contráctiles a la estimulación, al mismo tiempo que se presenta un aumento de la motilidad espontánea. El primer efecto es algo mayor en Tyrode normal que en Tyrode con bloqueantes (figuras nºs. 21 y 22).

b) Estimulación transmural en tira vesical ocho días después de la denervación.

Se produce una ligera disminución de la amplitud de las contracciones de respuesta a la estimulación, algo menor que en el caso de tiras procedentes de animales no sometidos a denervación previa. Ello no impide, sin embargo, que la motilidad espontánea se estimule con igual o mayor intensidad que en el caso anterior (figura nº 23).

c) Estimulación coaxial en vejiga completa:

La aplicación de apomorfina produce, a partir de dosis de 10^{-6} M, una disminución de la amplitud de las respuestas contráctiles, disminución que se va acentuando al aplicar dosis acumulativas mayores (figura nº 24). Este efecto es a veces tan marcado que, a dosis de 10^{-4} M, las contracciones de respuesta a la estimulación llegan a confundirse con las correspondientes a la motilidad espontánea.

Estos efectos se reflejan tanto en el registro isométrico como

en el de la presión interna vesical, y no disminuyen, sino que en todo caso se incrementan, al aplicar sucesivamente apomorfina y haloperidol (figura nº 25).

El haloperidol tiene en efecto una acción análoga a la de apomorfina, disminuyendo las respuestas contráctiles e incrementando a su vez la amplitud de la motilidad espontánea, que llega a ser incluso mayor que la de las contracciones producidas por la estimulación coaxial. Sin embargo, la aplicación posterior de apomorfina aumenta más bien la frecuencia de las contracciones que la amplitud de éstas (figura nº 26).

Se ha estudiado también, el efecto producido por un agente bloqueante alfa adrenérgico, como es el Priscol, que produce un incremento de la amplitud de las contracciones inducidas por la estimulación coaxial. La amplitud de estas contracciones disminuye por la aplicación posterior de apomorfina a igual concentración.

La aplicación de un bloqueante beta adrenérgico como es el Sumial, produce disminución de las contracciones de respuesta a la estimulación, sin modificar prácticamente la motilidad espontánea; observándose que la aplicación posterior de apomorfina a igual concentración la incrementa considerablemente mientras que las respuestas a la estimulación siguen disminuyendo, confundidas prácticamente con la motilidad espontánea (figura nº 27).

d) Vejiga completa. Estimulación a través de ambos nervios hipogástricos.

También en este caso la apomorfina produce un marcado efecto en lo que se refiere a la disminución de la amplitud de las respuestas contráctiles. Paralelamente se observa un aumento de la motilidad espontánea muy os-

tensible a dosis de 10^{-4} M. Este efecto es análogo en presencia de una misma concentración de Prisol. (figura nº 28). La adición de un bloqueante beta adrenérgico, como es el Sumial, produce una disminución de las respuestas contráctiles, efecto que tampoco es modificado por la presencia previa de apomorfina en el baño.

Si se aplica el haloperidol con posterioridad a la apomorfina, se incrementa la disminución de las contracciones de respuesta a la estimulación a través de ambos nervios inducida por igual concentración de apomorfina. (figura nº 29)

A su vez, el haloperidol aplicado previamente a la apomorfina produce una disminución de las respuestas contráctiles que es incrementada por la apomorfina (figura nº 30).

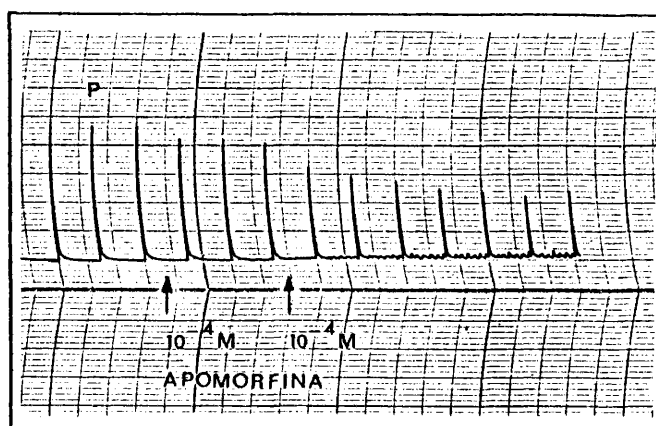


Figura nº 21.- Tira vesical. Estímulos transmurales patrón (P); aplicación de apomorfina 10^{-4} M, 10^{-4} M y estímulos transmurales subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 100, dur. 5sg); v.p. 2,5 mm/min.

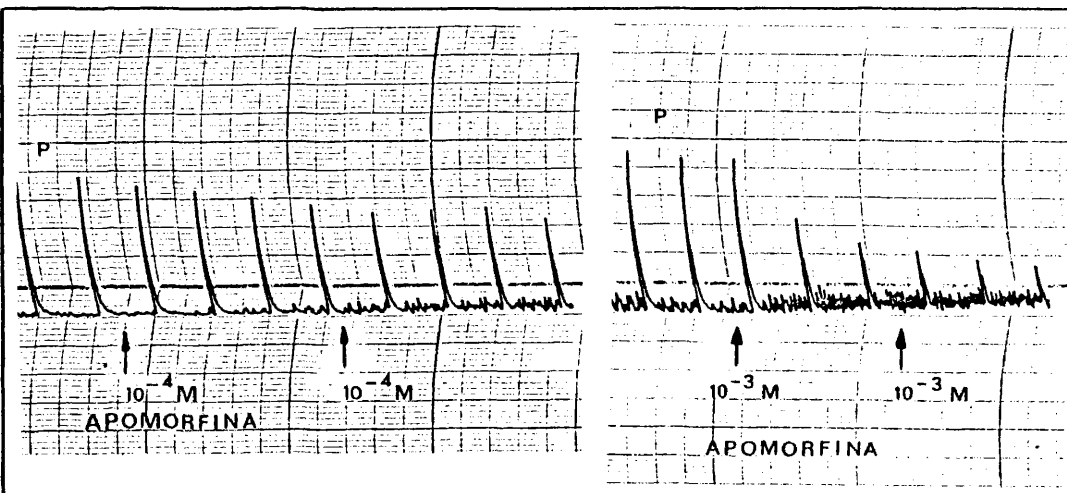


Figura nº 22.- Tira vesical. Estímulos transmurales patrón (P); aplicación de apomorfina 10^{-4} M y 10^{-4} M y 10^{-3} M y 10^{-3} M y estímulos transmurales subsiguientes. Tyrode guanetizado e hiosciaminizado; condiciones de estímulos (fr. 8, MS 2, vol. 50, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min,

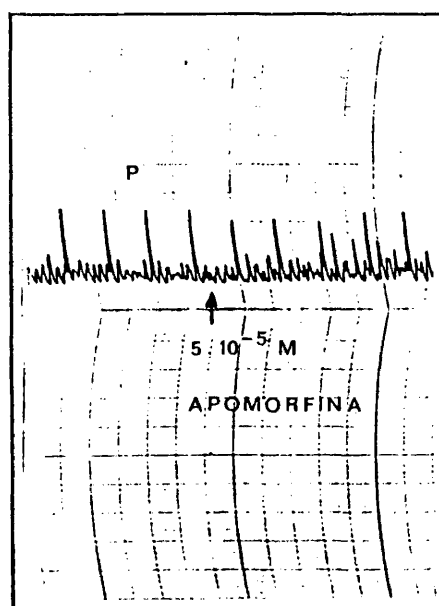


Figura nº 23.- Tira vesical denervada. Estímulos transmurales patrón (P); aplicación de apomorfina $5 \cdot 10^{-5}$ M y estímulos transmurales subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 70, dur. 5sg); v.p. 2,5mm/min

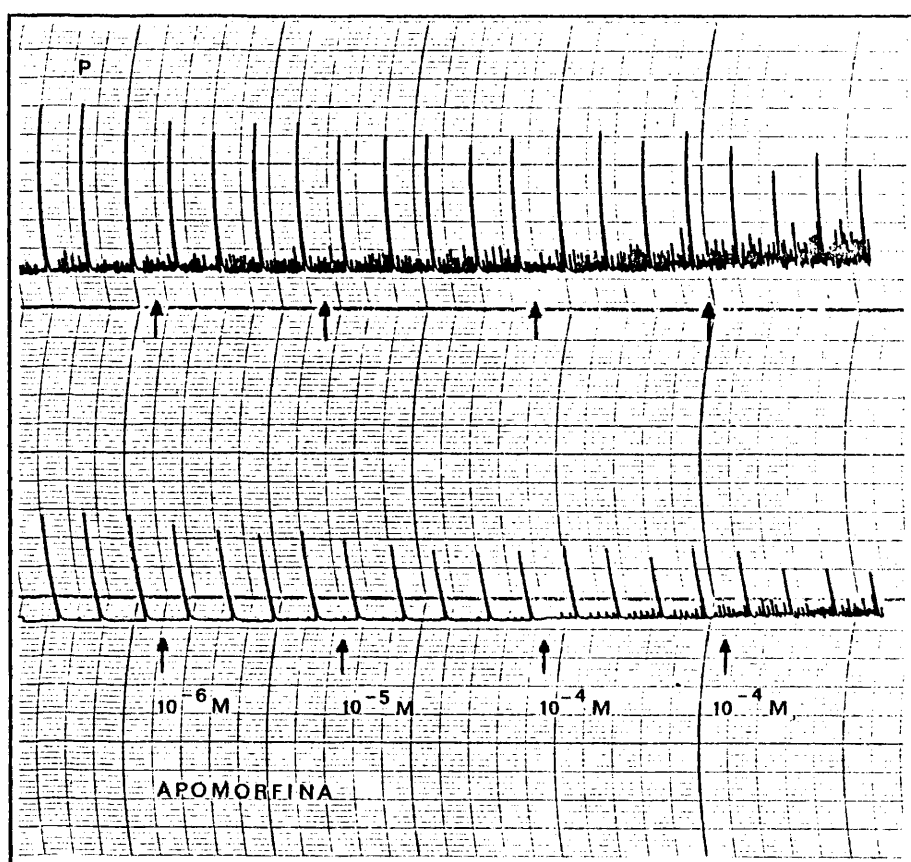


Figura nº 24.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos coaxiales patrón (P); aplicación de apomorfina 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M y 10^{-4} M respectivamente y estímulos coaxiales subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 60, dur. 5sg); v.p. 2, 5cm/min

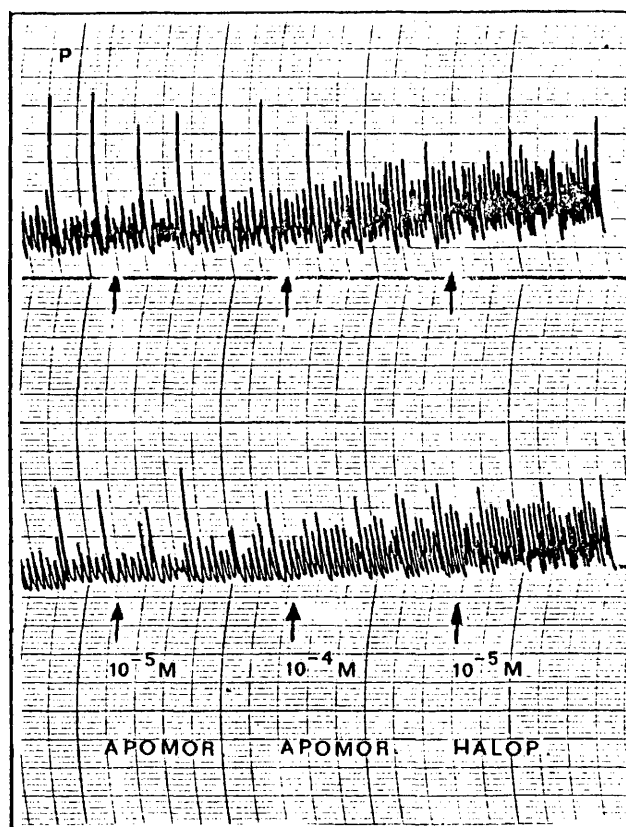


Figura nº 25.- Vejiga completa. Registro superior: tensión insométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos coaxiales patrón (P); aplicación de apomorfina 10^{-5} M, y 10^{-4} M y haloperidol 10^{-5} M y estímulos coaxiales subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 75, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

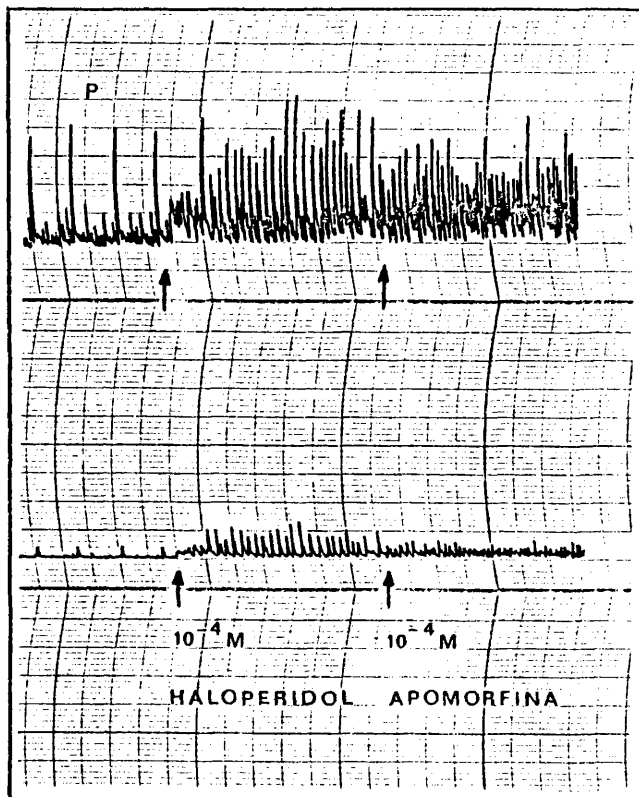


Figura nº 26.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos coaxiales patrón (P); aplicación de haloperidol 10^{-4} M y de apomorfinina 10^{-4} M y estímulos coaxiales sub siguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 19, dur 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

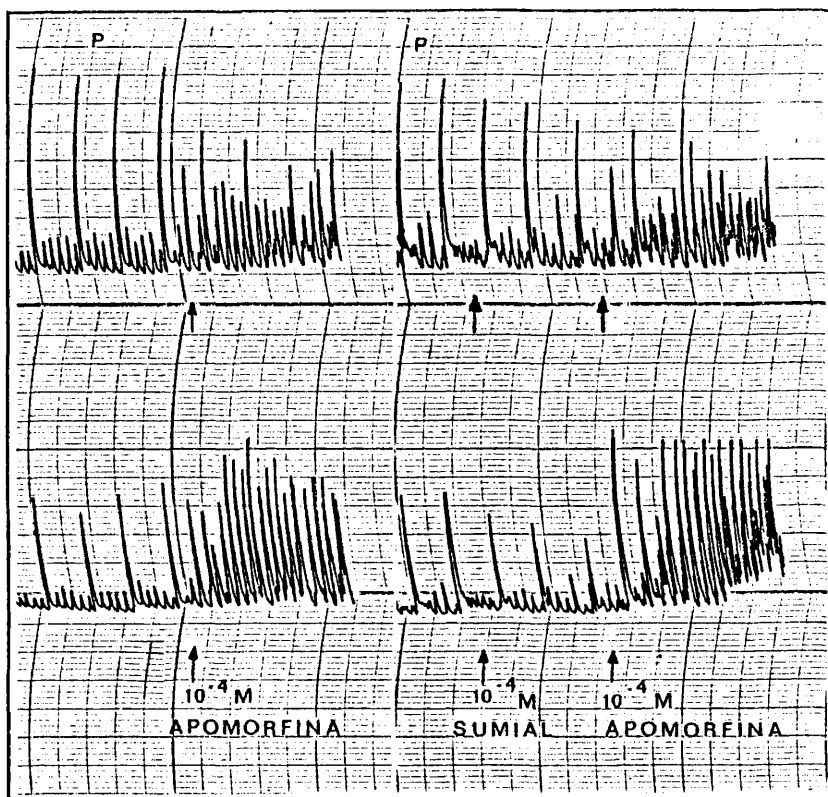


Figura nº 27.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos coaxiales patrón (P); aplicación de apomorfina 10^{-4} M y Sumial y apomorfina 10^{-4} M y 10^{-4} M respectivamente y estímulos coaxiales subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 8, MS 2, vol. 66, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

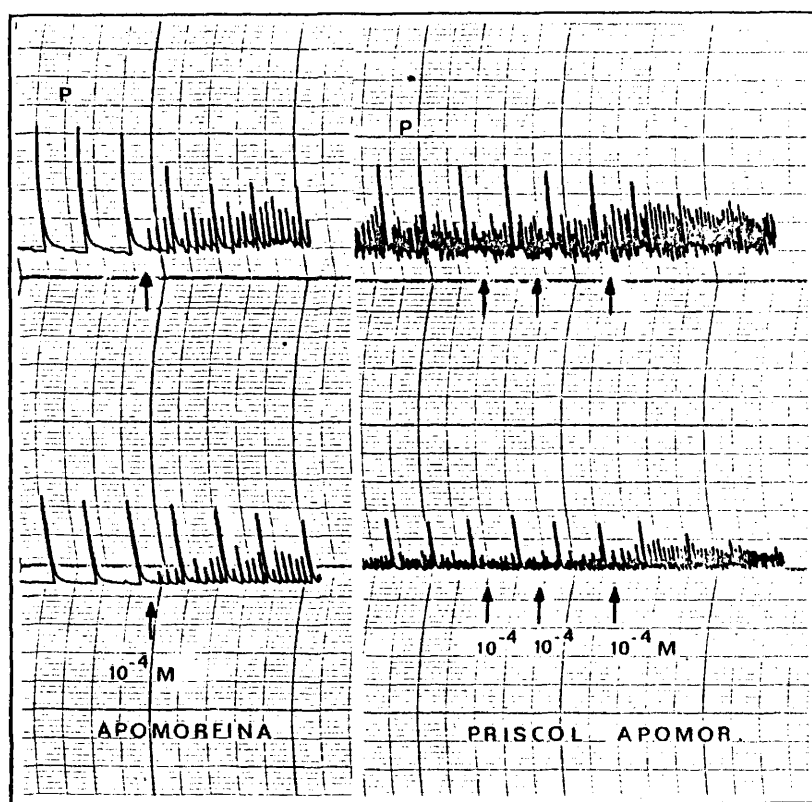


Figura nº 28.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de apomorfina 10^{-4} M y de Priscol y apomorfina 10^{-4} M y 10^{-4} M, y 10^{-4} M respectivamente y estímulos subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 70, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

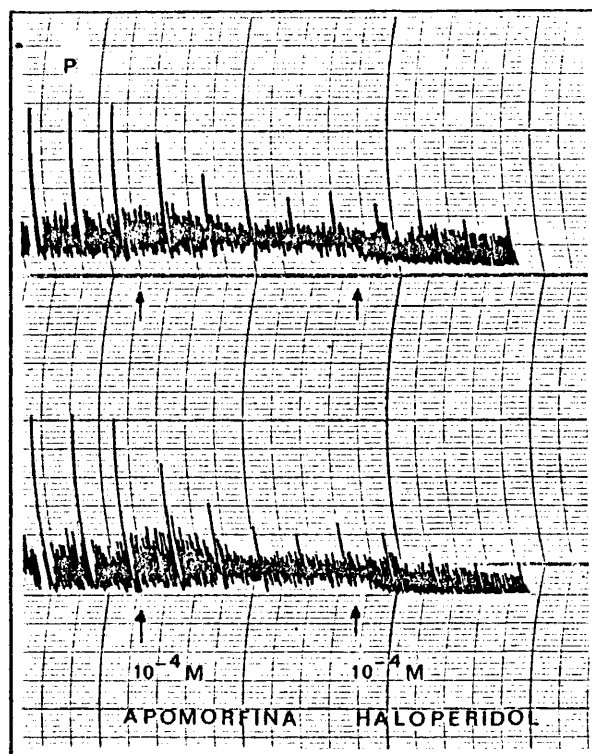


Figura nº 29.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de apomorfinina 10^{-4} M y de haloperidol 10^{-4} M y estímulos subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de (fr. 10, MS 2, vol. 87, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

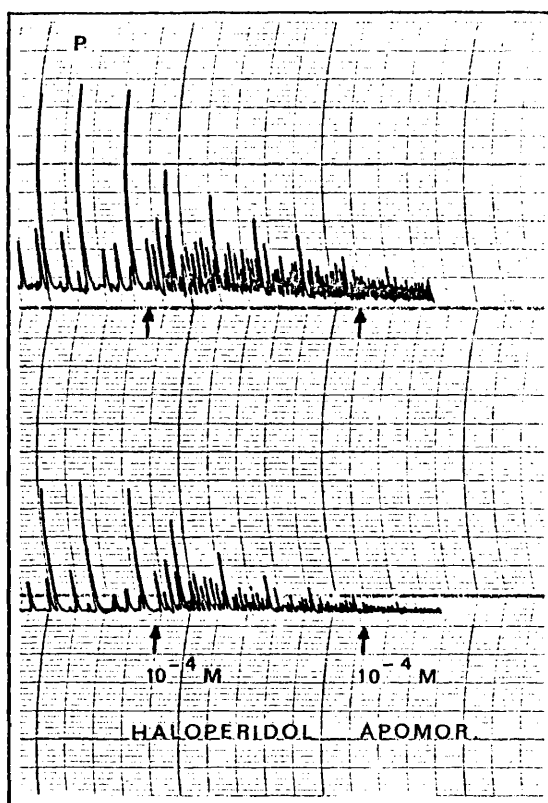


Figura nº 30.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estimulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de haloperidol 10^{-4} M y de apomorfina 10^{-4} M y estímulos subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, λ 2, vol. 30 dur. 5 sg); v. p. 2,5 mm/min.

III. 1. 3.- Haloperidol y azaperone.

III. 1. 3. 1.- Acción sobre la motilidad espontánea vesical.

a) En tiras vesicales:

Ambos compuestos, haloperidol y azaperone, ejercen un efecto estimulante sobre la motilidad espontánea, preferentemente en lo que se refiere a la amplitud de las contracciones, tanto en Tyrode normal como en Tyrode con bloqueantes (figuras nºs. 10, 11 y 31).

b) En tiras vesicales ocho días después de la denervación.

El efecto es análogo al que se acaba de reseñar.

c) En vejiga completa:

Los registros muestran un considerable incremento en la amplitud de las contracciones, visible ya a concentraciones de 10^{-5} M, fenómeno que también se ha observado en presencia de estimulación coaxial (figuras nºs. 25 y 26).

d) In vivo:

La administración intravenosa de haloperidol produce un incremento en la amplitud de las contracciones, corroborándose los resultados obtenidos "in vitro". La administración posterior de apomorfina por la misma vía, intensifica este efecto. (figura nº 32)

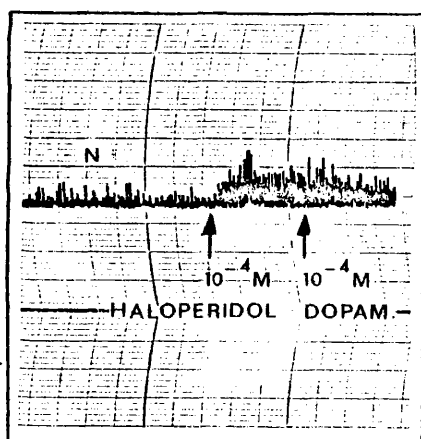


Figura nº 31.- Tira vesical. Contracción normal (N); aplicación de haloperidol 10^{-4} M y de dopamina 10^{-4} M. Tyrode guanetizado e hiosclaminizado; v.p. 2,5 mm/min.

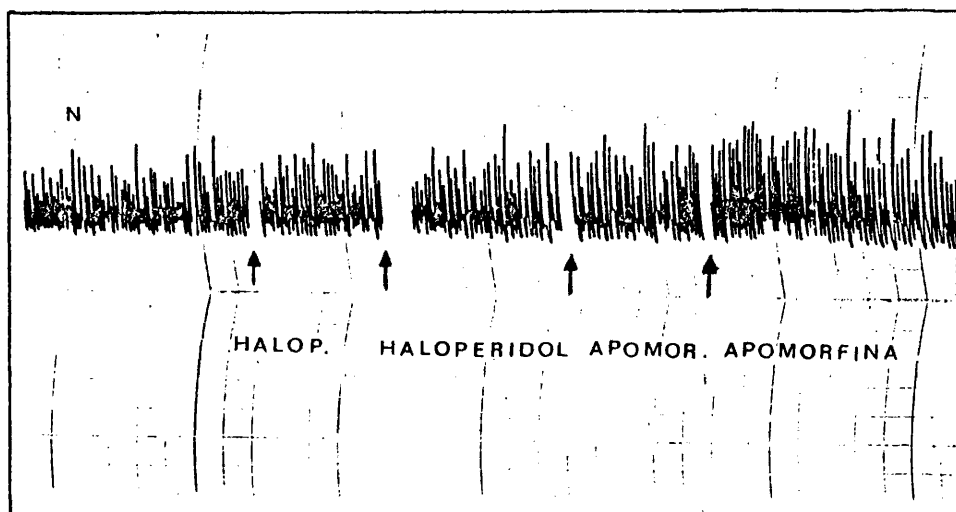


Figura nº 32.- Registro "in vivo". Contracción normal (N); administración de haloperidol 0,0035 mg/100 g peso de cobayo y 0,0017 mg/100 g y de apomorfina 0,014 mg/100 g y 0,014 mg/100 g. respectivamente. Registro de presión intravesical; v.p. 2,5 mm/min.

III. 1. 3. 2.- Acción del haloperidol y azaperone sobre las respuestas a la estimulación eléctrica:

a) Estimulación transmural en tira vesical:

Tanto en Tyrode normal como en Tyrode con bloqueantes colia-
drenérgicos, el haloperidol produce una intensa disminución concentracón-
dependiente en la amplitud de las respuestas contráctiles, (figuras nºs. 10
y 11), efecto que se acentúa si se aplica posteriormente dopamina o apomor-
fina.

Por otra parte, si se aplica dopamina en primer lugar, la dismi-
nución de las respuestas contráctiles es incrementada por el haloperidol
(Figura nº 11).

El efecto es análogo en presencia de apomorfina.

b) Estimulación transmural en tira vesical ocho días después de la denervación:

Los efectos son análogos a los que acabamos de mencionar.

c) Estimulación coaxial en vejiga completa:

En este caso tanto el registro isométrico como el de la presión intravesical reflejan el considerable efecto que producen ambos compuestos consistente en la disminución de la amplitud de las respuestas contráctiles, para concentraciones en el baño desde 10^{-6} M, al mismo tiempo que se modifica la motilidad espontánea. (figura nº 33).

Si se adiciona al baño la apomorfina previamente al haloperidol el efecto de éste sigue siendo el mismo, incrementándose por acción de la a-

apomorfin la disminución de las respuestas contráctiles. El efecto es análogo cuando se aplica la apomorfin con posterioridad al haloperidol. (figura nº 34). En este caso la amplitud de la motilidad espontánea se mantiene o disminuye, llegando a confundirse en ambos casos la respuesta a la estimulación con las contracciones propias de la fibra vesical.

d) Vejiga completa. Estimulación a través de ambos nervios hipogástricos:

Ambos fármacos, haloperidol y azaperone, manifiestan un comportamiento análogo, produciendo una disminución notable en la amplitud de las respuestas contráctiles, efecto que se alcanza a concentraciones mayores que en el caso de la estimulación coaxial (figuras nºs 35 y 36). Simultáneamente se incrementa la motilidad espontánea en los primeros minutos para estabilizarse o disminuir posteriormente.

La aplicación de dopamina o apomorfin, previa o posteriormente a estos fármacos en el baño, no altera el efecto depresor sobre las respuestas a la estimulación (figura nº 37). Este efecto tampoco se modifica por la presencia de un bloqueante alfa adrenérgico como el Priscol (figura nº 38).

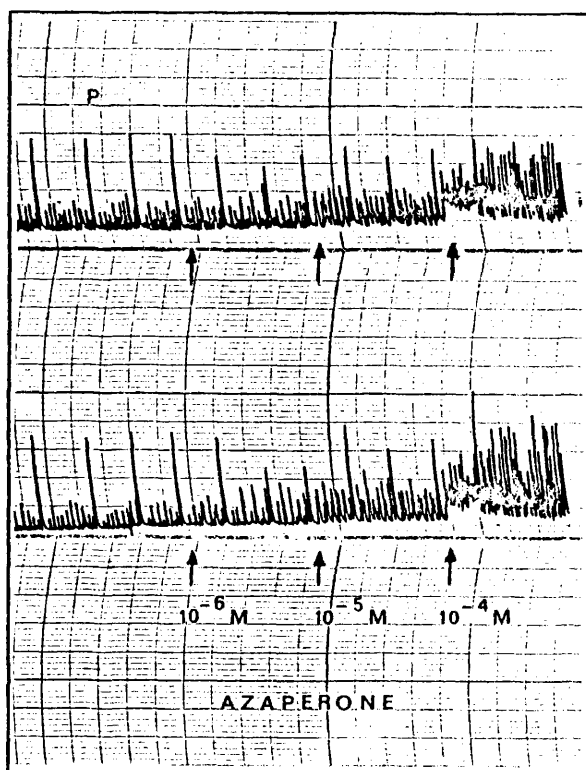


Figura nº 33.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos coaxiales patrón (P); aplicación de azaperone 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M respectivamente y estímulos coaxiales subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, VS 2, vol. 20, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

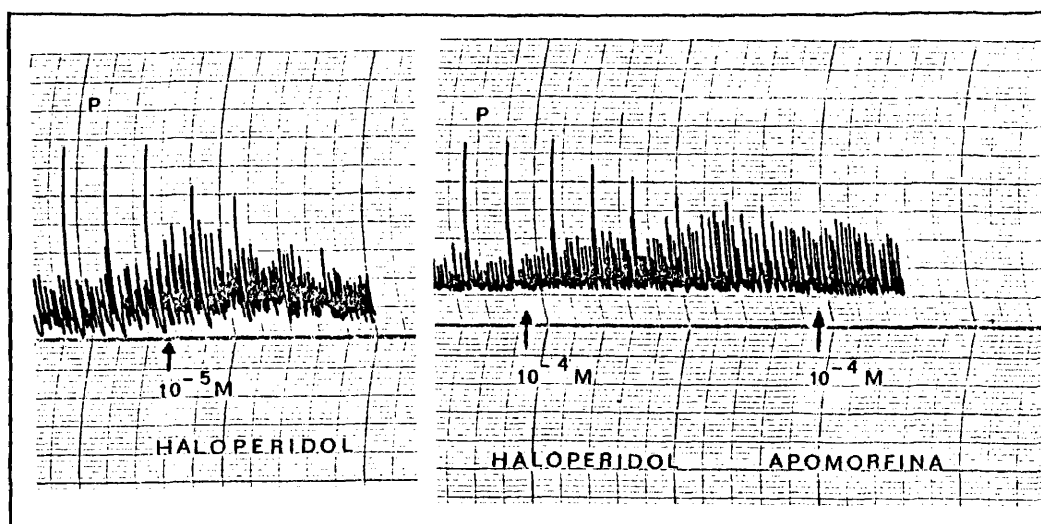


Figura nº 34.- Vejiga completa. Registro tensión isométrica. Estimulo coaxiales patrón (P); aplicación de haloperidol 10^{-5} M y de haloperidol y apomorfina 10^{-4} M y 10^{-4} M respectivamente y estímulos coaxiales subsiguientes. Tyro de normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 30, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

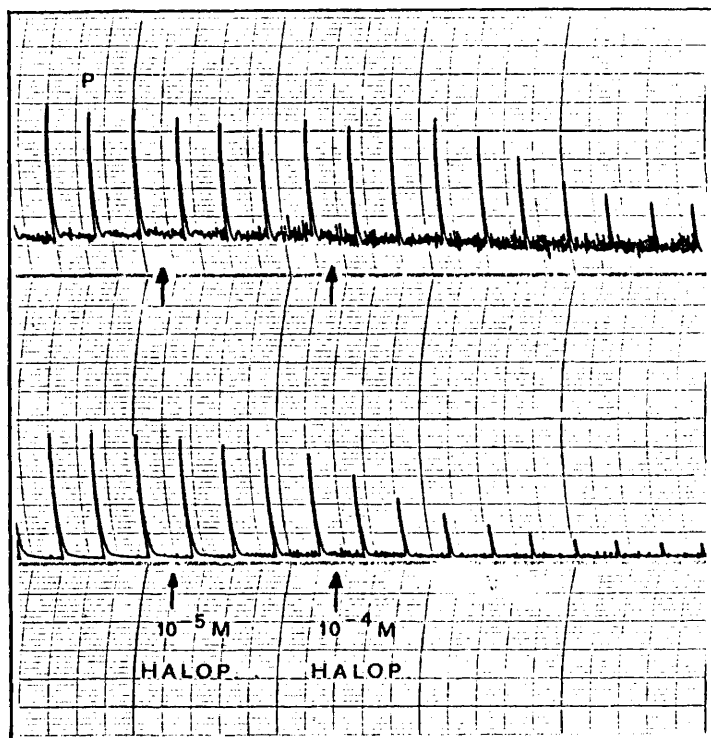


Figura nº 35.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estimulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de haloperidol 10^{-5} M y 10^{-4} M respectivamente y estímulos subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 60, dur. 5 sg); v.p. 2.5 mm/min.



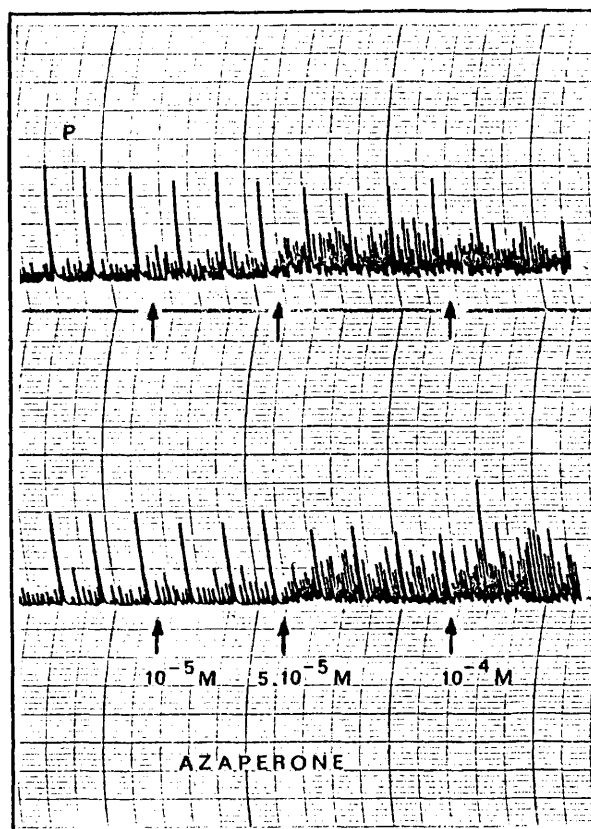


Figura nº 36.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de azaperone $10^{-5}M$, $5.10^{-5}M$ y $10^{-4}M$ respectivamente y estímulos subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 40, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

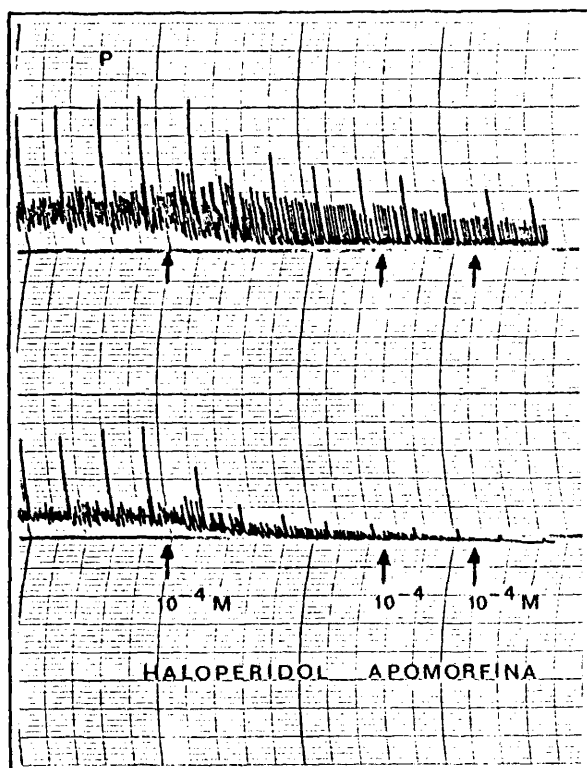


Figura nº 37.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estímulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de haloperidol 10^{-4} M y de apomorfinina 10^{-4} M y 10^{-4} M respectivamente y estímulos subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, NS 2, vol. 100, dur. 5 sg); v.p. 2,5 mm/min.

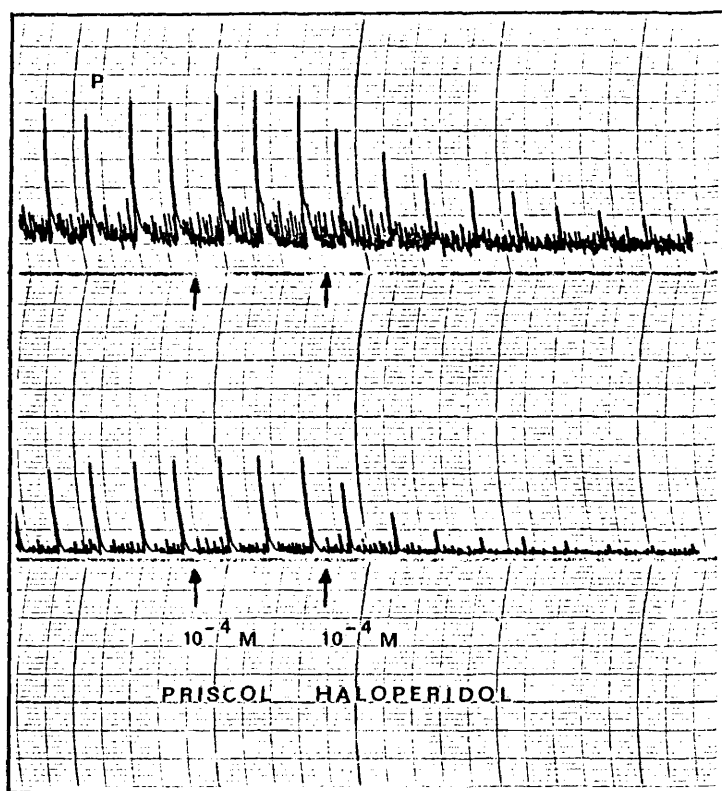


Figura nº 38.- Vejiga completa. Registro superior: tensión isométrica. Registro inferior: presión intravesical. Estimulos patrón a través de nervios hipogástricos (P); aplicación de Prisolol 10^{-4} M y de haloperidol 10^{-4} M y estímulos subsiguientes. Tyrode normal; condiciones de estímulos (fr. 10, MS 2, vol. 90, dur, 5 sg); v.p, 2,5 mm/min.

III. 1. 4.- Estudio estadístico.

Se ha realizado un estudio estadístico de los resultados obtenidos. Para ello se han valorado los porcentajes de disminución de la amplitud de las respuestas contráctiles, respecto a la amplitud de las respuestas contráctiles patrón, anteriores a la administración de los correspondientes fármacos. Se ha procedido de este modo con las diferentes dosis de los fármacos utilizados y los distintos tipos de estimulación, construyéndose así las siguientes curvas dosis-respuesta: figuras nºs. 39, 40, 41, 42, 43 y 44. Los datos expresados corresponden al valor medio de 6 a 8 experiencias para cada concentración. Las CI_{50} y CI_{25} (concentraciones inhibitorias del 50% y del 25% de las respuestas contráctiles) se han determinado por extrapolación de las curvas dosis - respuesta.

Por otra parte en la tabla nº I se reflejan los porcentajes de disminución de las contracciones de respuesta a los diferentes estímulos originados por dopamina, apomorfina, haloperidol y azaperone a una misma concentración de 10^{-4} M.

Finalmente encontramos resumidos en la tabla nº II las variaciones de la amplitud de la motilidad espontánea en los diferentes preparados vesicales frente a dichos fármacos.

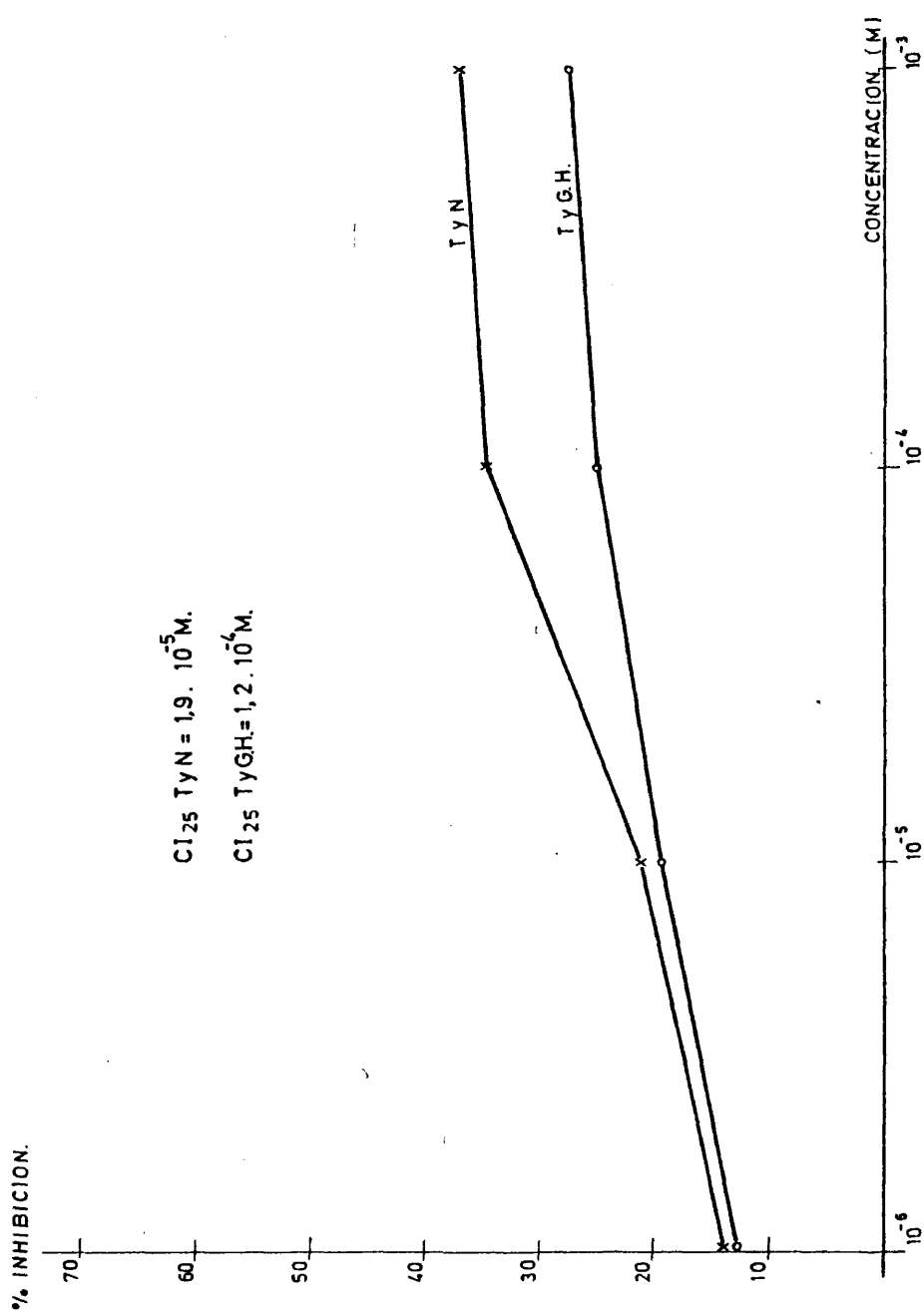
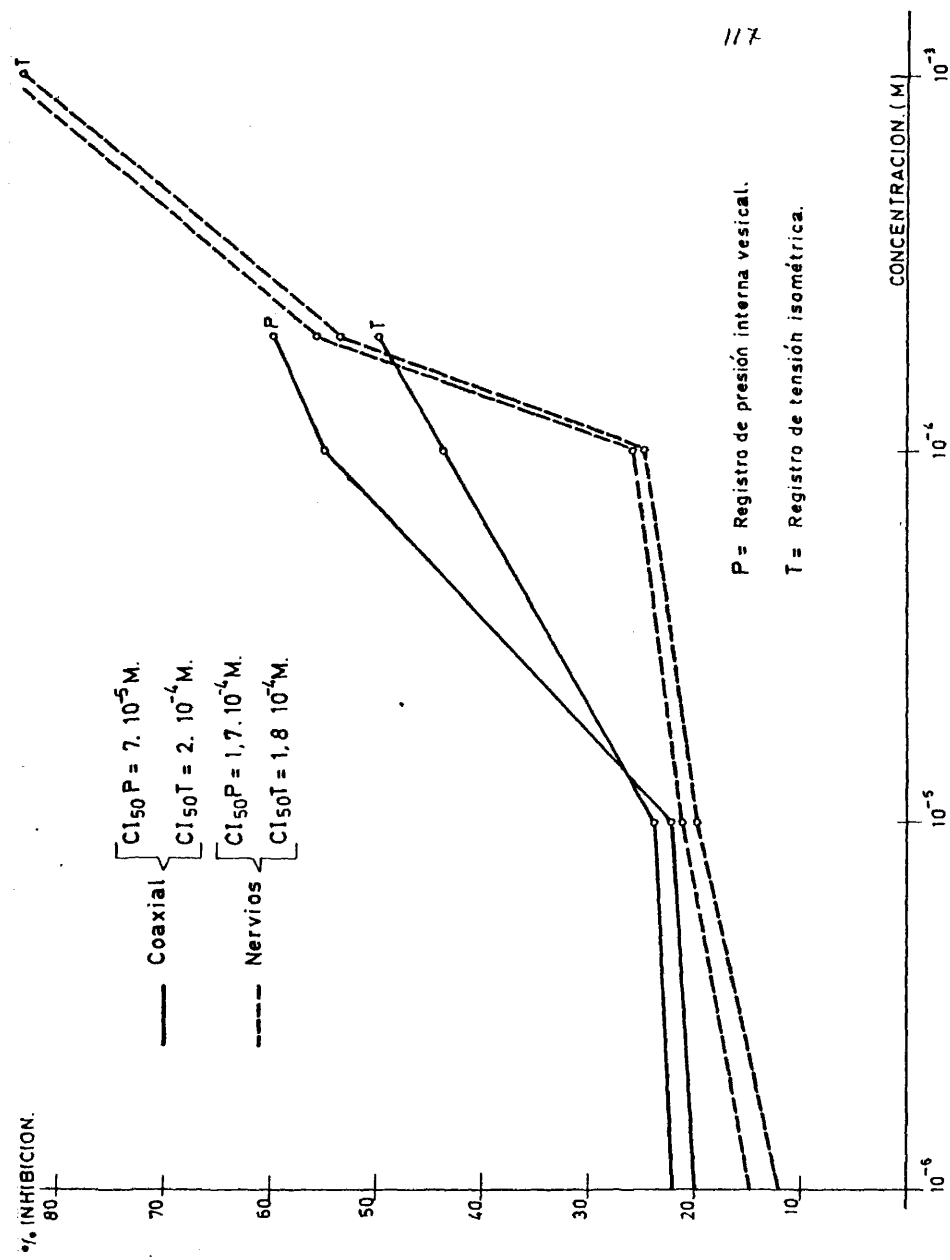


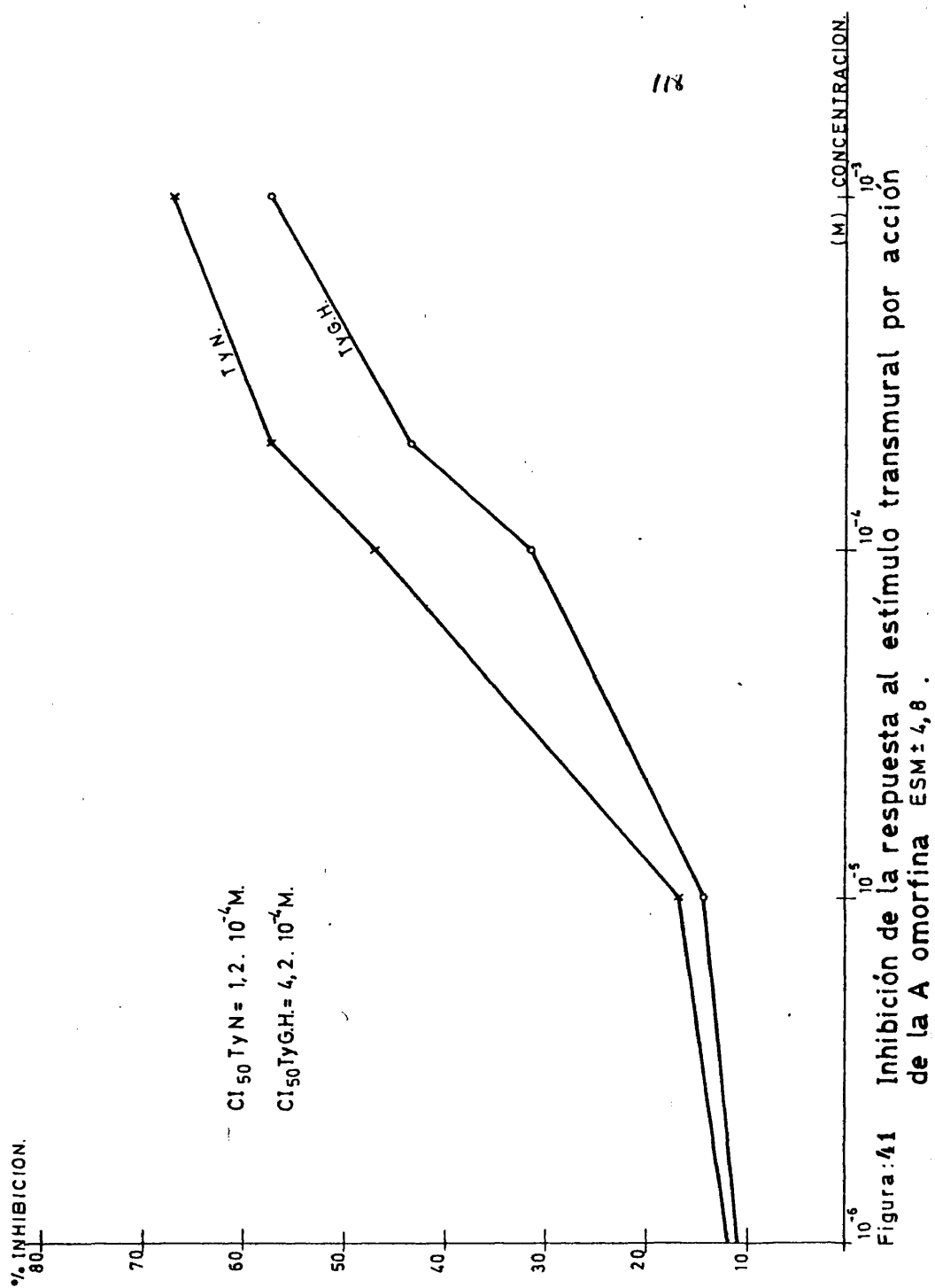
Figura: 39

Inhibición de la respuesta al estímulo transmural por acción de la Dopamina ($ESM \pm 4,3$).



117

Figura : 40
 Inhibición de la respuesta al estímulo coaxial ($ESM \pm 5,5$) y al estímulo através de nervios ($ESM \pm 6,8$) por acción de la Dopamina.



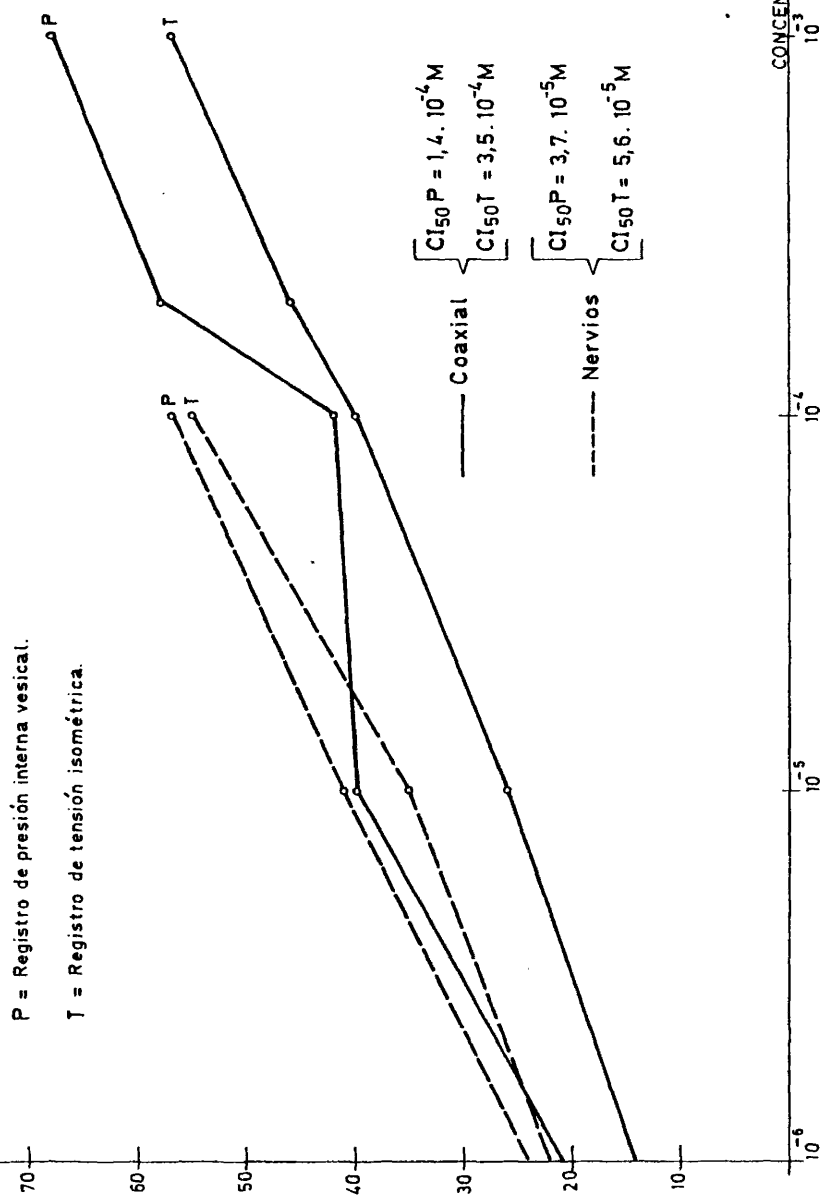


Figura: 42 Inhibición de la respuesta al estímulo coaxial ($ESM \pm 7,1$) y al estímulo a través de nervios ($ESM \pm 5,2$) por acción de la Apomorfina.

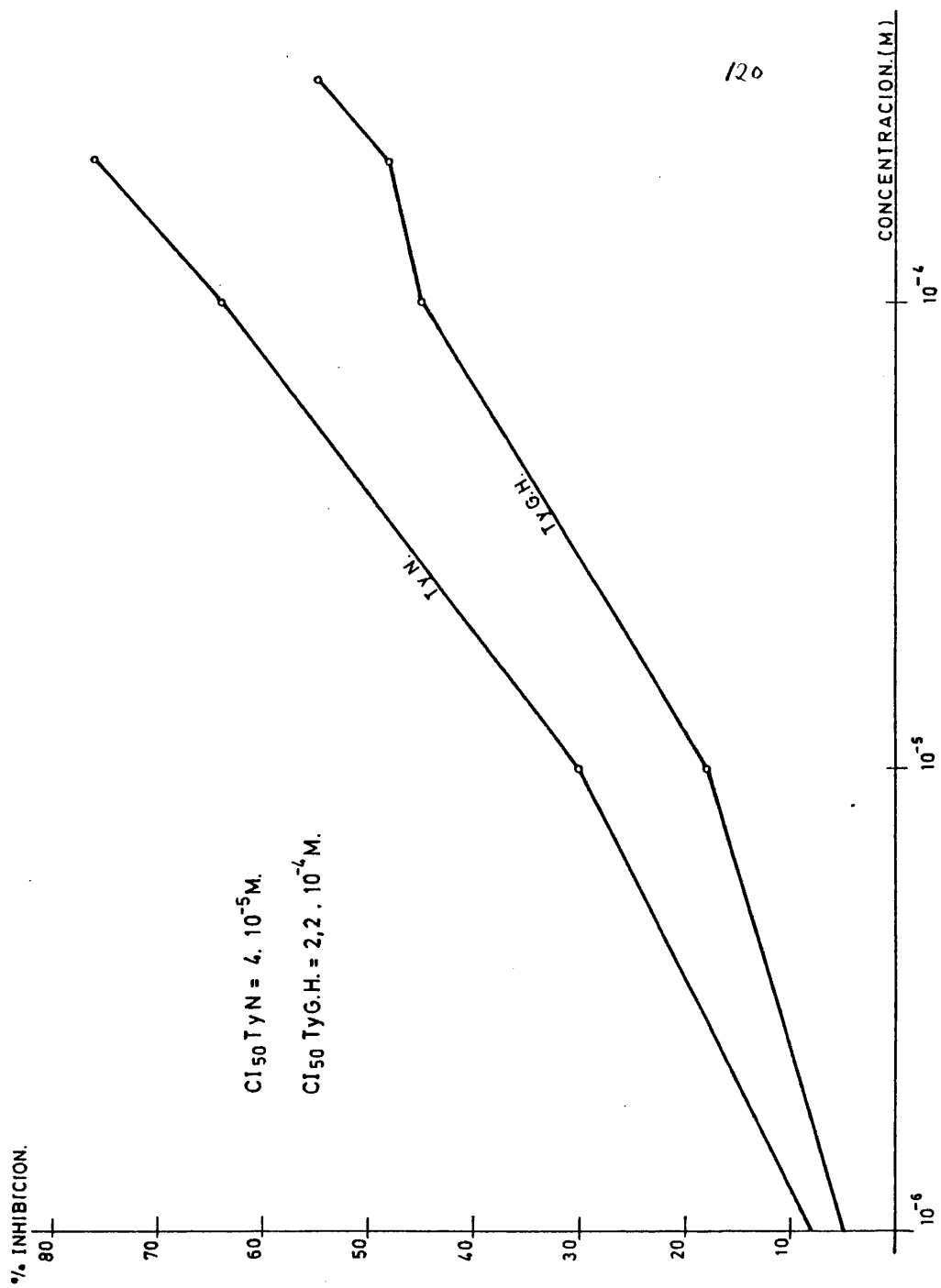


Figura: 43

s l tímulo ransm r l r ción i ESM: 7 .

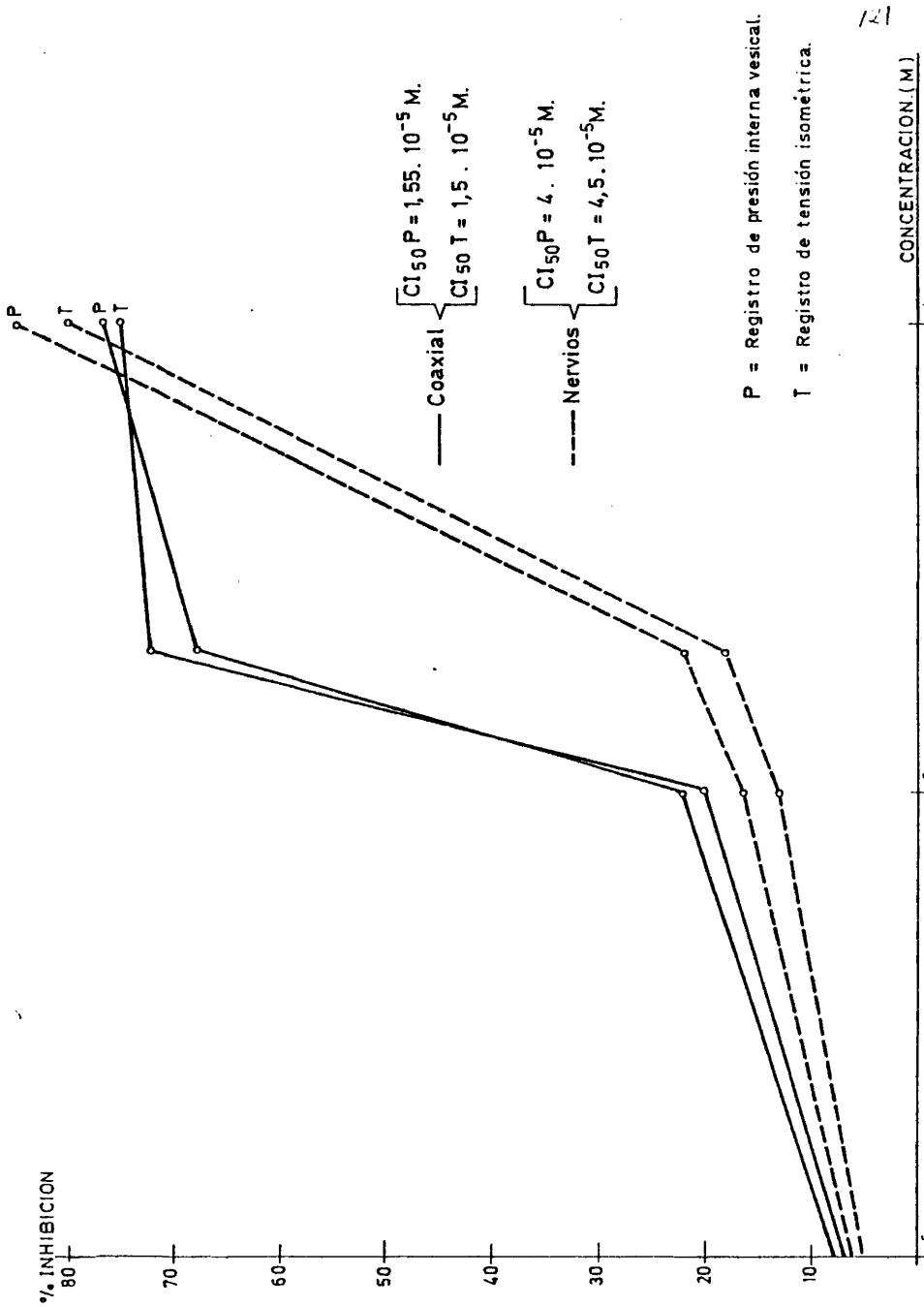


Figura 44 Inhibición de la respuesta al estímulo coaxial ($ESM \pm 7,2$) y al estímulo a través de nervios ($ESM \pm 7,5$) por acción del Haloperidol.

T A B L A I

% DE INHIBICION DE LAS CONTRACCIONES DE RESPUESTA A LOS DIFERENTES TIPOS DE ESTIMULACION.

	TRANSMURAL EN		COAXIAL EN		A TRAVES DE NERVIOS	
	TIRA VESICAL	TIRA DENERVADA	VEJIGA COMPLETA	VEJIGA COMPLETA	EN VEJIGA COMPLETA	
Ty N Ty GH			Tensión Isométrica Vesical	Presión Vesical	Tensión Isométrica Vesical	Presión Vesical
DOPAMINA 10^{-4} M.	35	25	24	44	50	25
APOMORFINA 10^{-4} M.	47	31	27	40	42	55
HALOPERIDOL 10^{-4} M.	64	45	54	75	76	80
AZAPERONE 10^{-4} M.				35	41	53
						56

T A B L A II

ACCION DE LA DOPAMINA, APOMORFINA, HALOPERIDOL Y AZAPERONE SOBRE LA AMPLITUD DE LAS CON-
TRACCIONES ESPONTANEAS EN LAS DIFERENTES PREPARACIONES VESICALES.

	TIRA VESICAL					TIRA VESICAL DENERVADA					VEJIGA COMPLETA					IN VIVO
	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}		
DOPAMINA	-	-	-	++		+-	+-	+	++		+-	+	++	+++		++
APOMORFINA	+-	+	++	+++		+-	+	+++	+++		+-	++	+++	++++		+++
HALOPERIDOL	+-	++	+++	++++		+-	++	+++	+++		+	+++	++++			+++
AZAPERONE	+	+	+++	++++		+	+	+++	+++		++	++	+++			++

III. 2.- Captación de ^3H - dopamina.

III. 2. 1.- Captación "in vivo" de ^3H - dopamina en vejiga de cobayo.

En primer lugar cabe resaltar el hecho de que no encontramos diferencias apreciables entre la captación de ^3H - dopamina por las diferentes partes de la vejiga estudiadas: fundus, trigono y detrusor; y es por lo que todos los resultados que exponemos a continuación se refieren siempre a los datos obtenidos tomando como punto de partida media vejiga. Asimismo, la inhibición de la unión total "in vivo" de ^3H - dopamina a la vejiga tampoco presentaba diferencias entre las diferentes zonas de la vejiga examinadas.

La tabla nº III muestra la unión total "in vivo" de ^3H - dopamina a vejiga de cobayo, tras la administración intravenosa de una dosis de 10 mg/Kg, 30 u Ci/Kg, expresada como porcentaje de dosis y, en presencia de diferentes antagonistas, administrados a una dosis de 0,1 mg/Kg.

Asimilando el valor de 100 a la captación "in vivo" de ^3H - dopamina cuando se administra en forma aislada, la tabla nº IV y la figura nº 45 representan las captaciones de dopamina respectivas en presencia de los antagonistas estudiados. Cada columna de la figura representa la media de 4 de terminaciones \pm ESM.

Los desplazamientos de ^3H - dopamina obtenidos son estadísticamente significativos (test de Student) y varían desde un 23% para la metoclopramida hasta un 50% para la spiperona.

T A B L A III

CAPTACION "IN VIVO" DE ^3H -DOPAMINA EN VEJIGA DE COBAYO TRAS SU ADMINISTRACION INTRAVENOSA A DOSIS DE 10 mg/kg Y 30 μC_1 /kg Y EL EFECTO PRODUCIDO POR LA PRESENCIA DE DIFERENTES ANTAGONISTAS (0,1 mg/kg, I.V)

	% radiactiv./g.	E.S.M.	n
^3H -DOPAMINA (CONTROL)	0,294	0,019	5
^3H -DOPAMINA + METOCLOPRAMIDA	0,215	0,035	4
^3H -DOPAMINA + F-1943	0,172	0,007	4
^3H -DOPAMINA + HALOPERIDOL	0,166	0,017	4
^3H -DOPAMINA + DOMPERIDON	0,151	0,011	4
^3H -DOPAMINA + SPIPERONA	0,147	0,019	4

T A B L A IV

DESPLAZAMIENTO "IN VIVO" DE ^3H -DOPAMINA (10 mg/kg I.V.) EN VEJIGA DE COBAYO EN PRESENCIA DE DIFERENTES ANTAGONISTAS (0,1 mg/kg)

	% CAPTACION	E.S.M.
^3H -DOPAMINA (CONTROL)	100	6,41
^3H -DOPAMINA + METOCLOPRAMIDA	77,25	12,45
^3H -DOPAMINA + F-1943	61,84	2,43
^3H -DOPAMINA + HALOPERIDOL	56,61	5,60
^3H -DOPAMINA + DOMPERIDON	51,38	4,00
^3H -DOPAMINA + SPIPERONA	50,04	6,31

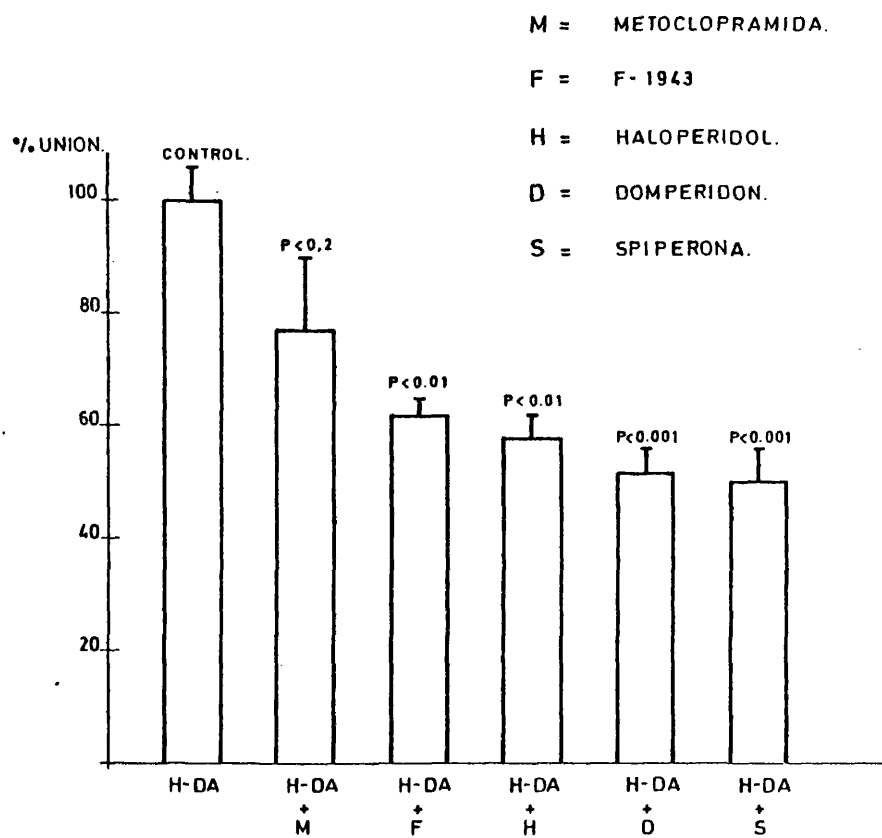


Figura: 45

Inhibición de la unión total "in vivo" de ^3H - Dopamina (10mg/Kg i.v. a vejiga de cobayo en presencia de diferentes antagonistas (0.1mg/Kg).

III. 2. 2.- Captación "in vitro" de ^3H - dopamina en homogeneizado de vejiga de cobayo.

La tabla nº V y la figura nº 46 muestran la fijación "in vitro" de ^3H - dopamina en preparaciones de membrana de vejiga de cobayo, siendo la concentración de proteínas del medio de incubación de 4,3 mg/ml y el porcentaje de retención de los filtros del 3,4%. La figura nº 46 representa en forma semilogarítmica el efecto de la concentración del radioligando sobre su porcentaje de unión. La tabla nº VI muestra las concentraciones de dopamina existentes, en forma unida, libre y la razón de ambas, en preparaciones de membrana de vejiga de cobayo para el rango de concentraciones totales de radioligando estudiado: 10^{-3}M a $7,5 \cdot 10^{-10}\text{M}$.

Representando en forma numérica la razón de picomoles de radioligando unido por miligramo de proteína respecto a nanomoles de radioligando libre por litro de homogeneizado, frente a picomoles de radioligando unido por miligramo de proteína, se obtiene una curva bifásica (figura nº 47). La figura 47 muestra el análisis de Scatchard para la unión de ^3H - dopamina, análisis que revela dos tipos de procesos de unión. El componente vertical representa la unión saturable que corresponde al rango de concentraciones de radioligando $7,5 \cdot 10^{-10}$ - $2,5 \cdot 10^{-9}\text{M}$, mientras que el componente horizontal designa la unión no saturable correspondiente al intervalo de concentraciones, $7,5 \cdot 10^{-9}$ - 10^{-3}M .

El análisis de regresión lineal de los puntos de la componente vertical, que define la unión saturable, revela un coeficiente de correlación $r = 0,8284$. La constante de asociación en equilibrio obteni-

da a través de la pendiente de dicha recta es $K_A = 4,06 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, es decir una constante de muy alta afinidad y con una densidad de lugares receptores de 60 picomoles por miligramo de proteína.

Las tablas n.ºs. VII, VIII y IX y las figuras n.ºs. 48, 49, 50 muestran los estudios de inhibición de la unión de ^3H - dopamina en preparaciones de membranas de vejiga de cobayo en presencia de diferentes antagonistas.

Asimilando el valor de 100 al porcentaje de unión de ^3H - dopamina ($2,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$), las tablas n.ºs VII, VIII y IX muestran los porcentajes de unión respectivos cuando se adicionan diferentes concentraciones de antagonistas directamente al medio de incubación.

Representando en forma semilogarítmica el porcentaje de unión en función de la concentración de antagonista se determina la CI_{50} (concentración de antagonista que inhibe en un 50% la unión del radioligando), que ha resultado ser para la spiperona de 0,16 nM, valor que determina una K_i , constante de inhibición de 0,09 nM (figura n.º 48).

En condiciones análogas, los parámetros de unión para el domperidon revelaban una menor potencia inhibitoria, con un valor de $\text{CI}_{50} = 10 \text{ nM}$ y $K_i = 6,21 \text{ nM}$ (figura n.º 49), potencia inhibitoria que ha resultado ser a su vez superior a la del F - 1943, compuesto de síntesis análogo a la metoclopramida (JENNER y MARSDEN, 1979), que presentaba una $\text{CI}_{50} = 20 \text{ ug/ml}$. y $K_i = 12,42 \text{ ug/ml}$ (figura n.º 50).

T A B L A V

FIJACION "INVITRO" DE ^3H -DOPAMINA EN HOMOGENEIZADO
DE VEJIGA DE COBAYO.

^3H -DOPAMINA (M)	% UNION	E.S.M.
10^{-3}	6,48	0,61
10^{-4}	5,44	0,46
10^{-5}	6,40	0,45
10^{-6}	6,92	0,80
10^{-7}	5,49	0,54
$2,5 \cdot 10^{-8}$	6,29	0,72
$7,5 \cdot 10^{-9}$	7,11	0,23
$2,5 \cdot 10^{-9}$	8,70	1,24
$1,25 \cdot 10^{-9}$	17,35	2,56
$7,5 \cdot 10^{-10}$	24,02	3,28

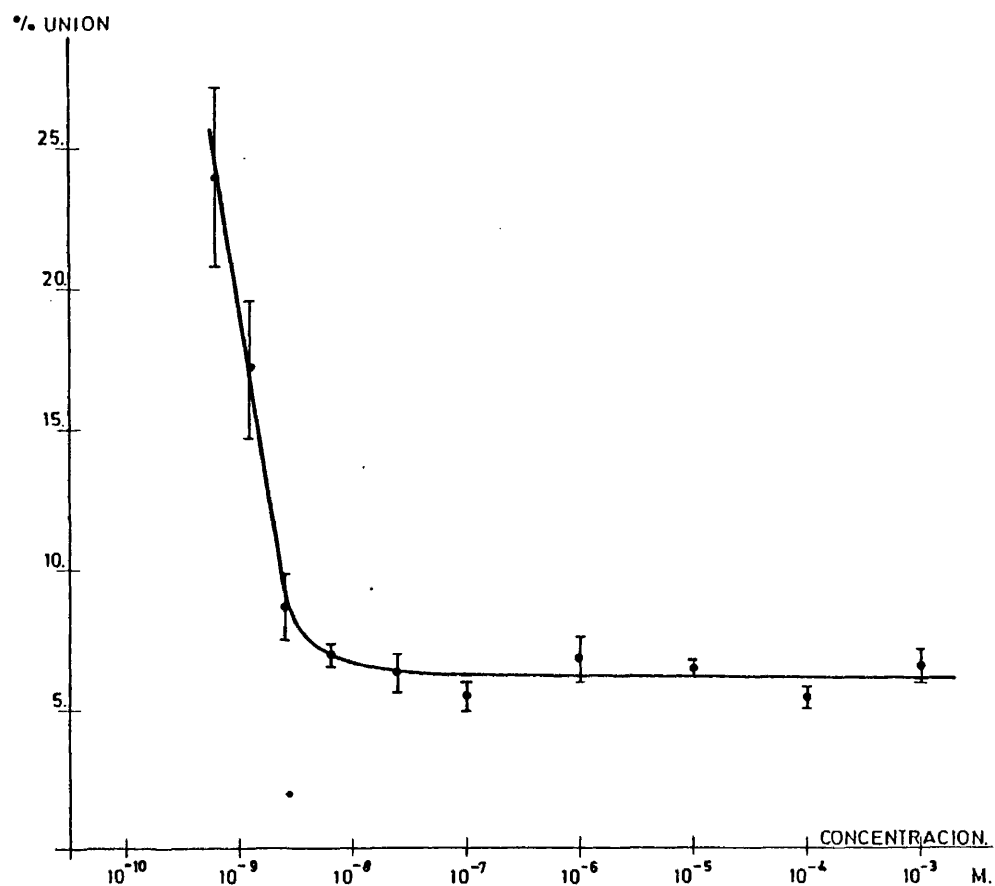


Figura : 46

Captación "in vitro" concentración-dependiente de ^3H -Dopamina en homogeneizado de vejiga de cobayo.

T A B L A VI

NIVELES DE DOPAMINA EN FORMA UNIDA, LIBRE Y LA RAZON DE AMBAS, PARA EL INTERVALO DE CONCENTRACIONES TOTALES $10^{-3} \text{ M} - 7,5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ EN HOMOGENEIZADO DE VEJIGA DE COBAYO.

^3H -DOPAMINA (M)	LIBRE (M)	UNIDO (M)	UNIDO (M/mg)	$\frac{\text{UNIDO (M/mg)}}{\text{LIBRE (M)}}$
10^{-3}	$9,3 \cdot 10^{-4}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	0,0160
10^{-4}	$9,5 \cdot 10^{-5}$	$5,4 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,0133
10^{-5}	$9,4 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	0,0160
10^{-6}	$9,3 \cdot 10^{-7}$	$6,9 \cdot 10^{-8}$	$1,6 \cdot 10^{-8}$	0,0172
10^{-7}	$9,4 \cdot 10^{-8}$	$5,5 \cdot 10^{-9}$	$1,3 \cdot 10^{-9}$	0,0138
$2,5 \cdot 10^{-8}$	$2,3 \cdot 10^{-8}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$3,6 \cdot 10^{-10}$	0,0156
$7,5 \cdot 10^{-9}$	$7,0 \cdot 10^{-9}$	$5,3 \cdot 10^{-10}$	$1,2 \cdot 10^{-10}$	0,0171
$2,5 \cdot 10^{-9}$	$2,3 \cdot 10^{-9}$	$2,2 \cdot 10^{-10}$	$5,1 \cdot 10^{-11}$	0,0222
$1,25 \cdot 10^{-9}$	$1,0 \cdot 10^{-9}$	$2,2 \cdot 10^{-10}$	$5,1 \cdot 10^{-11}$	0,0510
$7,5 \cdot 10^{-10}$	$6,1 \cdot 10^{-10}$	$1,4 \cdot 10^{-10}$	$3,3 \cdot 10^{-11}$	0,0541

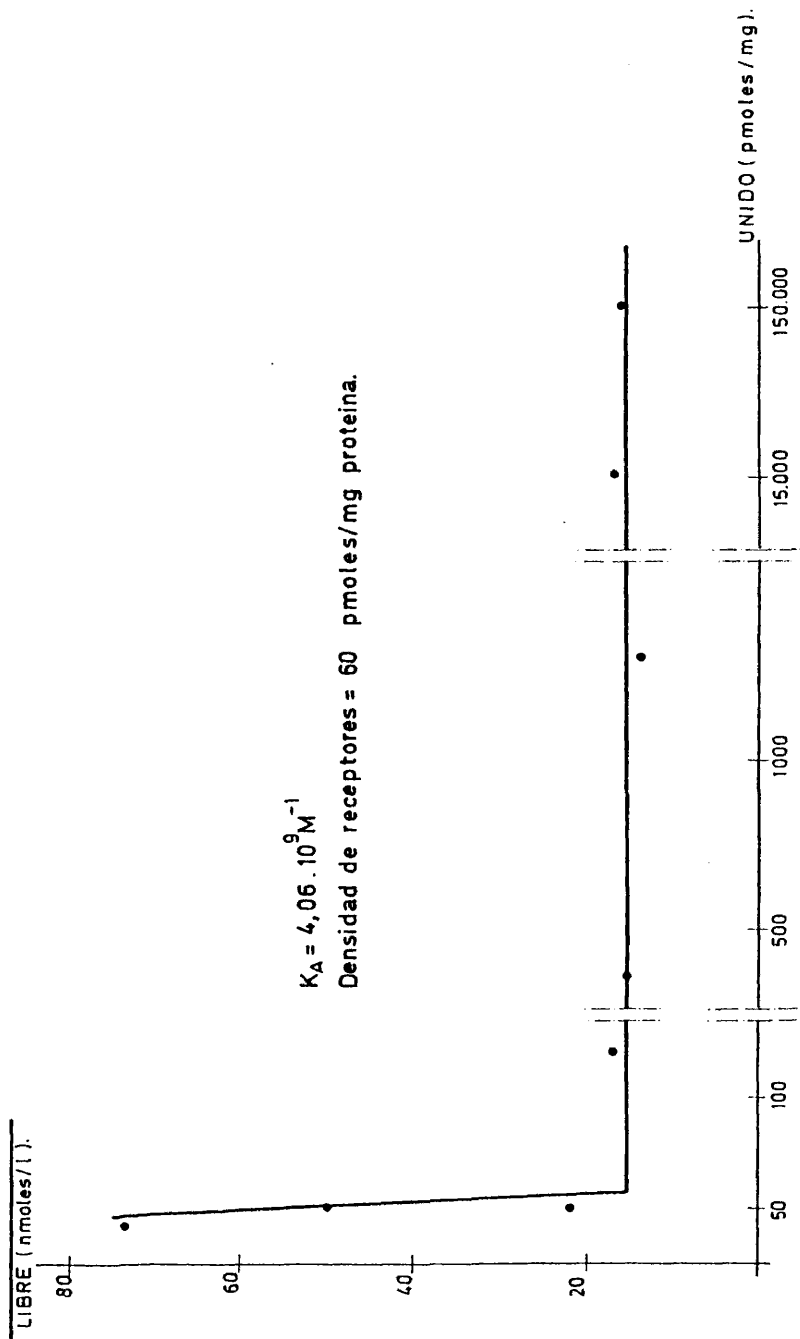


Figura: 47

Análisis de Scatchard de la unión "in vitro" de 3H -Dopamina en homogeneizado de vejiga de cobayo.

T A B L A VII

EFFECTO CONCENTRACION - DEPENDIENTE DE LA SPIPERONA SOBRE LA UNION DE ^3H -DOPAMINA (2,5 mM) EN HOMOGENEIZADO DE VEJIGA DE COBAYO.

SPIPERONA (M)	% UNION	E.S.M.
—	100	6,5
$2,5 \cdot 10^{-12}$	63,3	8,1
$2,5 \cdot 10^{-11}$	56,8	6,7
$2,5 \cdot 10^{-10}$	48,9	5,3
$2,5 \cdot 10^{-9}$	45,4	4,0
$2,5 \cdot 10^{-8}$	38,5	3,8

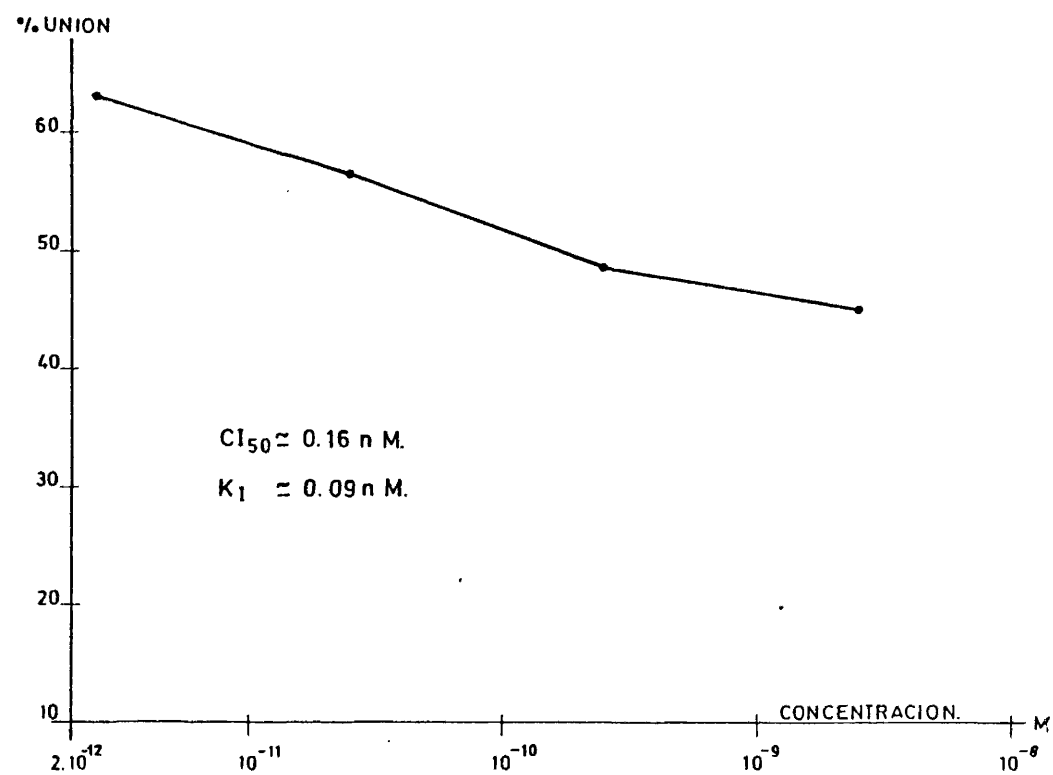


Figura : 48

Inhibición de la unión de ^3H -Dopamina (2.5 n M.) por Spiperona en homogeneizado de vejiga de cobayo.

T A B L A VIII

EFFECTO CONCENTRACION - DEPENDIENTE DEL DOMPERIDON SOBRE LA UNION DE ^3H - DOPAMINA (2,5 nM) EN HOMOGENEIZADO DE VEJIGA DE COBAYO.

DOMPERIDON	% UNION	E.S.M.
—	100	6,5
$2,5 \cdot 10^{-10}$	68,1	5,2
$2,5 \cdot 10^{-9}$	56,3	7,0
$2,5 \cdot 10^{-8}$	46,6	4,7
$2,5 \cdot 10^{-7}$	42,1	3,6
$2,5 \cdot 10^{-6}$	38,9	3,5

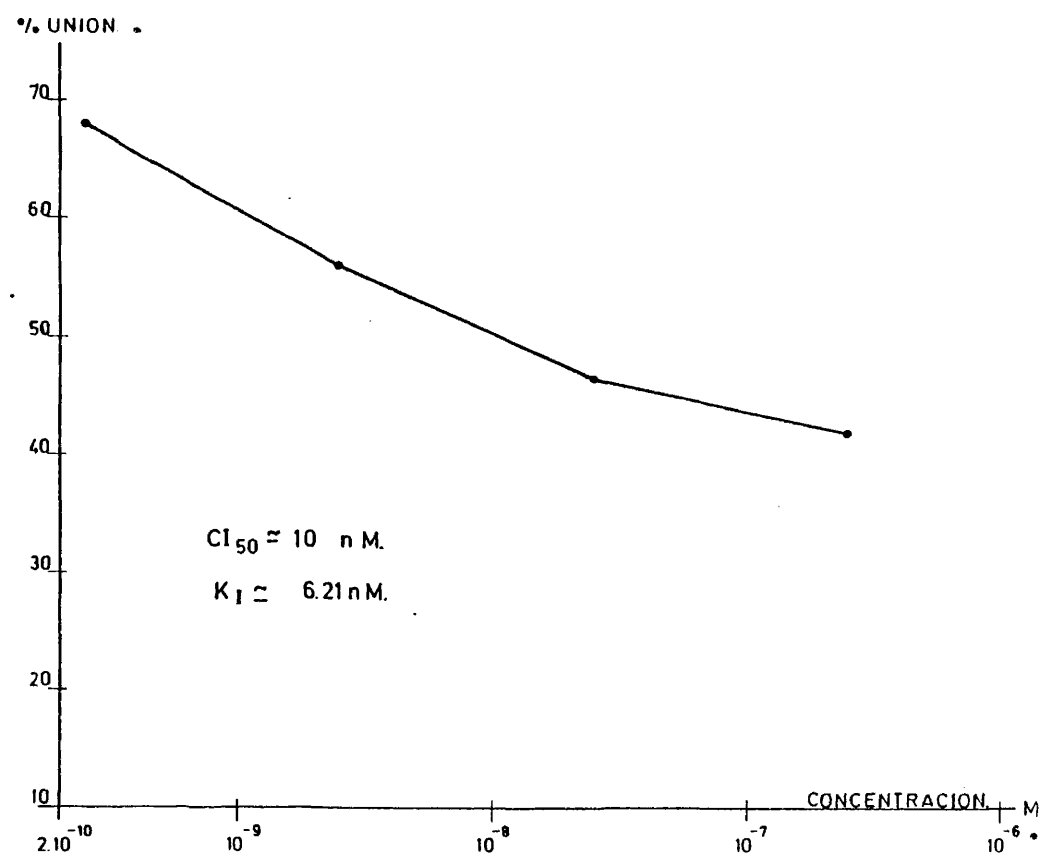


Figura 49

Inhibición de la unión de ^3H - Dopamina (2.5 nM .) por Domperidon en homogeneizado de vejiga de cobayo.

T A B L A IX

EFFECTO CONCENTRACION - DEFENDIENTE DEL F - 1943 SOBRE
LA UNION DE ^3H -DOPAMINA (2,5 nM) EN HOMOGENEIZADO DE
VEJIGA DE COBAYO

F - 1943 mg/ml	% UNION	E.S.M.
—	100	6,5
$9,4 \cdot 10^{-6}$	81,7	4,6
$9,4 \cdot 10^{-5}$	54,2	6,3
$9,4 \cdot 10^{-4}$	42,0	2,8
$9,4 \cdot 10^{-3}$	36,1	3,4

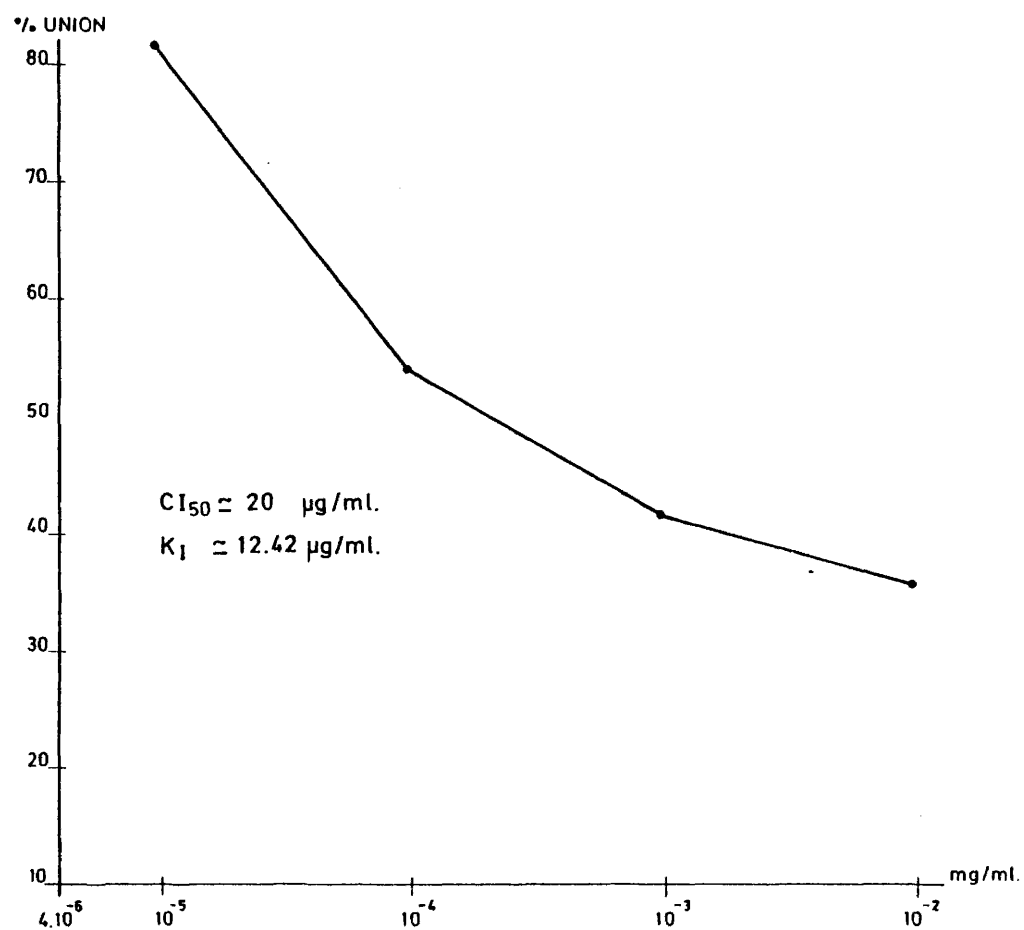


Figura : 50

Inhibición de la unión de ^3H - Dopamina (2.5 nM). por F-1943
en homogeneizado de vejiga de cobayo.

127 60

DISCUSSION

IV. DISCUSION

Las respuestas de la vejiga son complejas y es por ello, por lo que a lo largo de este trabajo, se hace mención de la pluralidad de la inervación de dicho órgano. Este hecho justifica también que las respuestas estimulantes e inhibitorias discurren dentro de ciertos límites, respuestas que además no son comparables a las obtenidas en fibras de otros órganos aislados, bien sean puros o denervados.

Cuando se habla de respuestas de agentes inhibidores no se pueden evitar las acciones colaterales que éstas puedan ejercer sobre otros sistemas neurotransmisores existentes en la vejiga, como son los colinérgicos, adrenérgicos, purinérgicos, etc.

Existen trabajos (VAN NUETEN et al, 1978) que presentan la acción de la dopamina concebida dentro de un sistema dopaminérgico en otros órganos como el estómago, donde éste estaba claramente establecido. Nosotros nos atrevemos a postular que es posible la existencia de un receptor dopaminérgico en la vejiga ya que hay, indudablemente, una respuesta tanto a la dopamina como a la apomorfina, sin pre juzgar si, así como sucede en algunas áreas del sistema nervioso central, el comportamiento dopaminérgico y apomorfnico sea o no exactamente el mismo.

Se tiene la impresión de que no disponemos de un bloqueante específico de estos receptores dopaminérgicos en vejiga ya que, los utilizados hasta ahora, realizan tan sólo procesos modificatorios cuan

do se trata de motilidades espontáneas, y sin embargo, se comportan casi como si fueran agonistas frente a los estímulos coaxiales.

Como ya está referido en la literatura, los efectos del estímulo indirecto a través del nervio son complejos dado el propio carácter mixto de estos mismos nervios.

La especificación de un efecto farmacológico en vejiga tampoco ha sido un hecho ostensible en vejiga denervada, debido a que tal denervación es, en definitiva, tan sólo una denervación parcial de dicho órgano.

La discusión de los hechos que se han presentado se puede establecer a la luz de las publicaciones que mencionaremos más tarde, en los que la variabilidad de circunstancias es muy diversa, postulándose la existencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos con una sensibilidad farmacológica diferente. Por otra parte, hay que pensar en la posible existencia de receptores presinápticos en vejiga, que podrían modificar ostensiblemente el comportamiento de esta fibra lisa. Por ello la discusión la centramos primeramente en demostrar la existencia de un receptor específico en la vejiga y, en segundo lugar, en exponer el comportamiento de este receptor en función de los agentes a que se encuentre sometido.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados sobre el comportamiento espontáneo y las respuestas contráctiles a la estimulación eléctrica vesical revelan que la dopamina se comporta como un agente estimulante de la motilidad espontánea. Ahora bien, para que este efecto se manifieste en las tiras vesicales se precisan concentraciones supe-

riores a las que producen el mismo efecto en los preparados de vejiga completa. En las experiencias realizadas "in vivo" también se produce un efecto estimulante con un aumento de la amplitud y ritmo de las contracciones, corroborándose los resultados obtenidos "in vitro".

La acción de la dopamina sobre las respuestas a la estimulación eléctrica es de tipo inhibitorio, presentándose una inhibición dosis - dependiente de las respuestas contráctiles, tanto en tiras vesicales con o sin denervación, sometidas a estimulación transmural, en presencia de Tyrode normal o con bloqueantes coliadrenérgicos, como en vejiga completa sometida a estimulación coaxial o a través de nervios hipogástricos.

Como puede observarse en la tabla nº I y en las figuras nºs 39 y 40, la inhibición de la contracción es en general mayor con estímulo coaxial que con estímulo transmural o a través de nervios, hecho que hace pensar en la presencia de un receptor presináptico además del postsináptico.

El haloperidol y azaperone, antagonistas convencionales de receptores dopaminérgicos en otros órganos, manifiestan un efecto estimulante sobre la motilidad espontánea vesical. Como se observa en la tabla nº II este efecto se manifiesta con mayor o menor intensidad en todos los preparados vesicales.

Por otra parte, cuando estos antagonistas se aplican con posterioridad a la dopamina, no inhiben el incremento de la motilidad espontánea producido por ésta, sino que manifiestan cierto sinergismo y por lo tanto, bajo este punto de vista, no se comportarían como anta

gonistas.

Un hecho análogo se presenta en las preparaciones sometidas a la estimulación eléctrica, donde ambos compuestos, haloperidol y azaperone, presentan un efecto inhibitorio con mayor o menor intensidad según el tipo de estimulación (tabla nº I). Cuando se aplican con posterioridad a la dopamina, manifiestan el mismo efecto, no pudiéndose hablar por tanto de un antagonismo, sino más bien de un efecto sinérgico de estos compuestos.

No existe una relación entre las experiencias realizadas en intestino con dopamina y las realizadas por nosotros en vejiga. La existencia de receptores dopaminérgicos en intestino es confusa. FERRI *et al.* (1977) en sus trabajos ya mencionados demostraron que la dopamina potencia la acción depresora de la morfina sobre el intestino, hecho que atribuyen en parte a la posible liberación de dopamina en este órgano. HEIMANS (1975) sospecha la existencia de un receptor propiamente dopaminérgico, no selectivo a los antagonistas de la morfina y que no sería sensible al haloperidol.

Estudiando la acción de la apomorfina, agonista de los receptores dopaminérgicos del sistema nervioso central, se ha encontrado que actúa sobre la motilidad espontánea produciendo un efecto estimulante ya desde bajas concentraciones (tabla nº II).

Como se observa en las figuras nºs. 41 y 42 la apomorfina presenta un efecto inhibitorio análogo al de la dopamina en lo que se refiere a las respuestas a la estimulación, comportándose en general como un agonista más perfecto que la dopamina, ya que actúa generalmente a menor con

centración y produciendo un mayor efecto.

La acción inhibitoria producida por la apomorfina sobre las respuestas a estímulos eléctricos se potencia en presencia del haloperidol, de la misma manera que se potencia la acción estimulante sobre la motilidad espontánea, encontrándonos por tanto frente a un efecto agonista de estos compuestos.

Es de señalar que el haloperidol, fármaco del grupo de las butirofenonas, tenidas fundamentalmente como depresoras, se comporta como estimulante del ritmo, amplitud y tono de la fibra lisa vesical. Su acción inhibitoria sobre las respuestas a estimulación eléctrica es, en general, en todas las preparaciones, más intensa que la producida por los otros fármacos estudiados (tabla nº I y figuras nºs. 43 y 44).

Tanto en lo que se refiere al comportamiento espontáneo como el inducido por la estimulación eléctrica, no se ha podido encontrar el antagonismo clásicamente establecido a nivel del sistema nervioso central.

Los resultados obtenidos en el estudio de la captación "in vivo" de ^3H - dopamina en vejiga de cobayo no revelan diferencias apreciables entre el comportamiento de las diferentes zonas estudiadas: fundus, trigono y detrusor. Del mismo modo que respecto a la captación, la inhibición de la unión total "in vivo" tampoco presentaba diferencias significativas entre las diferentes zonas ensayadas.

La unión total "in vivo" de ^3H - dopamina, tras la administración intravenosa de 10 mg/Kg, ha alcanzado un valor del 0,294 ($\pm 0,019$)%

radiactividad/g de vejiga respecto a la dosis total administrada (tabla nº III), Esta unión se encuentra inhibida tras la administración simultánea de 0,1 mg/kg de diferentes antagonistas de dopamina. Se han obtenido desplazamientos "in vivo" de ^3H - dopamina estadísticamente significativos observándose que la spiperona, domperidon y haloperidol son los agentes inhibitorios más potentes llegando a producir una reducción en la unión del 49,9%; 48,62; y 43,39% respectivamente, mientras que la metoclopramida en las mismas condiciones produce una inhibición de 22,7% (tabla nº IV figura nº 45).

Las tablas nºs V y VI y la figura nº 46 muestran la interacción concentración-dependiente "in vitro" de ^3H -dopamina en preparaciones de membrana de vejiga de cobayo con una concentración proteica en el medio de incubación de 4,3 mg/ml.

Análogamente a lo observado por VARMUZA et al. (1978) con la unión ^3H -haloperidol, el análisis de Scatchard de la unión total "in vitro" de ^3H -dopamina conduce a una curva bifásica, correspondiente a dos tipos de procesos de unión (figura nº 47).

Generalmente se ha aceptado que la unión no específica de los neurolépticos en preparaciones hísticas es de naturaleza no saturable. El segmento vertical de la curva bifásica representa la unión específica, mientras que el horizontal representa la unión no específica. El componente vertical se designa como saturable y es lo que lleva a establecer que la unión específica solamente podría modificarse por la adición de un agente competitivo. Así, se puede estudiar el desplazamiento del radioligando variando las concentraciones de una droga testigo, a una concentración de ligando conocida que satura los lugares de unión específica, en nuestro caso ^3H - dopamina 2,5 nM. Finalmente, se ha postulado (VARMUZA et al, 1978) que el uso

de un gran exceso de ligando "frio" es, probablemente, un método inválido para determinar la unión no específica. Este método solo sirve para reducir la actividad específica del radioligando al mismo tiempo que aumenta su concentración.

El análisis de Scatchard (figura nº 47) ha revelado que la unión "in vitro" de ^3H - dopamina a membranas de vejiga de cobayo es saturable o específica para un rango de concentraciones de radioligando $7,5 \cdot 10^{-10}$ - $2,5 \cdot 10^{-9}$ M. A medida que la concentración del radioligando aumenta, se hace más predominante la unión no saturable, de tal modo que cuando se alcanza una concentración de $7,5 \cdot 10^{-9}$ M se entra de lleno en el componente horizontal de la curva bifásica que designa dicha unión, unión no saturable que se mantiene en todo el rango de concentraciones más elevadas estudiado hasta 10^{-3} M.

El análisis de regresión lineal de los puntos que definen la unión saturable presenta un coeficiente de correlación $r = 0,8284$ que es altamente significativo. La constante de asociación en el equilibrio obtenida a través de la pendiente de dicha recta, es $K_A = 4,06 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ valor que evidencia la presencia de lugares de unión dopaminérgica específica con una afinidad muy elevada. La intersección de esta recta con la abscisa del eje de coordenadas permite calcular la concentración de los lugares receptores específicos que ha resultado ser de 60 picomoles por miligramo de proteína. Estos resultados muestran que el valor de K_A para la unión de ^3H - dopamina en preparaciones de membrana de vejiga de cobayo se halla dentro del mismo rango que el observado por EELD et al. (1978) en homogeneizado de núcleo caudado de bovino. Por otro lado, la afinidad por el receptor dopaminérgico en vejiga de cobayo está bastante de acuer-

do con la encontrada por CREESE et al. (1978) para la unión ^3H - spiperona en núcleo caudado de bovino. Estos receptores dopaminérgicos se encuentran asociados a nivel intracelular con estructuras de membrana.

Las tablas n.ºs. VII, VIII y IX muestran los efectos concentración - dependiente de inhibidores dopaminérgicos convencionales sobre la captación de ^3H - dopamina (2,5 nM) en homogeneizado de vejiga.

La spiperona se comporta como un potente antagonista de la dopamina. Compite con ^3H - dopamina por los lugares de unión en homogeneizado de vejiga siendo la CI_{50} , es decir, la concentración que inhibe en un 50% la unión del radioligando 0,16 nM (figura n.º 48), transformando el valor de CI_{50} en el valor de K_i , constante de inhibición utilizando la ecuación de HARLEY y SEEMAN (1978), se obtiene una K_i para la spiperona de 0,09 nM. LADURON et al. (1978) han observado recientemente que la spiperona se comporta como el ligando de elección para el estudio de receptores neurolepticos, presentando asimismo una afinidad muy alta (10^{-9} M^{-1}) para los lugares de unión específica. Del mismo modo que estos autores, hemos observado que la unión dopaminérgica es específica sólo se detecta cuando la concentración del radioligando es suficientemente baja, alrededor de 10^{-9} M . A concentraciones de ligando superiores como por ejemplo 10^{-7} M , la unión es de tipo no saturable.

En condiciones análogas, el domperidón presenta una menor potencia inhibitoria con un valor de $\text{CI}_{50} = 10 \text{ nM}$ y $\text{K}_i = 6,21 \text{ nM}$ (figura n.º 49). La CI_{50} del domperidón está de acuerdo con los valores determinados por LEYSEN et al. (1979) frente a la unión de ^3H - spiperona en diferentes áreas límbicas cerebrales. Concentración además a la

que VAN NUETEN et al. (1978) observaron que el domperidon antagonizaba el efecto inhibitorio de la actividad espontánea del estómago de cobayo originado por dopamina, y es por ello por lo que los efectos gastrocinéticos del domperidon podían explicarse, en parte, por su interferencia con receptores dopaminérgicos en estómago.

Finalmente, en las mismas condiciones los parámetros de unión para el F - 1943 revelaban una potencia inhibitoria aún menor, con un valor de $CI_{50} = 20 \text{ ug/ml}$ y $KI = 42 \text{ ug/ml}$ (figura nº 50).

Evaluando el efecto de los diferentes antagonistas de receptores dopaminérgicos estudiados sobre la unión "in vitro" de ^3H -dopamina en homogenizado de vejiga, podemos concluir que la spiperona es el agente inhibitorio más potente, y en lo que se refiere al valor de CI_{50} , sesenta y dos veces más potente que el domperidon y éste a su vez más potente que el F - 1943.

Se ha observado una cierta correlación entre el comportamiento "in vivo" e "in vitro" ya que la spiperona, antagonista que posee la mayor afinidad para los lugares de unión "in vitro", era a su vez también el agente más potente en el análisis "in vivo".

La presencia del componente vertical en la curva de captación "in vitro" de ^3H - dopamina (figura nº 47), según el criterio Scatchard, nos lleva a aceptar la existencia de un enlace específico. El desplazamiento de ^3H - dopamina supondría, en este caso, el desplazamiento del componente específico del mismo que lo diferenciaría del no específico, ya que se hallaba a cabo en el rango de concentraciones correspondiente a la zona saturable o específica. El hecho tampoco se invalida debido a

que los agentes competitivos se han utilizado a concentraciones adecuadas que no originarían el desplazamiento que podría producirse por un exceso de los mismos.

Las condiciones del ensayo nos conducen a resultados que son muy comparables a los encontrados en el sistema nervioso central.

Según el criterio de WHITAKER y SEZMAN (1979) hay que pensar que la potencia neuroselectiva es la que realmente justifica el fenómeno de la captación, captación que varía en cada caso según las características eléctricas, estéricas o enantiomórficas de la molécula. Este comportamiento es lo que justifica que moléculas tan diferentes como son la dopamina y la apomorfina puedan tener propiedades muy análogas en cuanto a la captación en determinados preparados.

La afinidad de los neurolépticos por los receptores dopaminérgicos es variable (CREESE et al., 1977) y se ha observado en diferentes partes del cerebro que la actividad de la spiperona duplica a la del haloperidol. Asimismo, las velocidades de disociación de uno y otro justifican que las experiencias a determinados tiempos sean variables. Por otra parte, CREESE et al. (1977) han encontrado que la 2 - bromo - alfa - ergocriptina, agonista farmacológico, tiene gran afinidad por los lugares de unión de la spiperona. Todo ello justifica el comportamiento de compuestos que funcionalmente pueden ser o no análogos.

LEYSEN et al. en 1978 han confirmado, a nivel del sistema nervioso central, la hipótesis inicial de que el receptor dopaminérgico se bloquea por agentes neurolépticos pero, sin embargo, observaron que en determinadas áreas cerebrales los neurolépticos aumentan considerablemen

te la renovación de la dopamina. Este hecho indica que puede establecerse una competición entre fármacos que se comportan como agonistas y que a veces no hay correlación entre el potencial de inhibición (CI_{50}) y el efecto farmacológico estudiado por el test convencional de apomorfina en rata. Todo ello lleva a pensar en la existencia de una heterogeneidad de receptores dopaminérgicos.

VAN NUETEN et al (1978) han encontrado que la dopamina administrada intraarterialmente relaja el estómago y decrece su actividad espontánea. El haloperidol y el domperidon inhiben selectivamente este efecto de la dopamina. Con tales observaciones estos investigadores demostraron la existencia de receptores dopaminérgicos en estómago de cobayo.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que la secretina inhibe el efecto vagal de vaciamiento gástrico. Este efecto puede ser revertido por el domperidon. Estos autores concluyen por ello que la secretina podría actuar directa o indirectamente liberando dopamina. Sin embargo estos efectos observados en el estómago no se ven tan claramente en la vejiga.

NIEMEGERERS y JANSEN (1979) han llevado a cabo una clasificación sistemática de los antagonistas de la dopamina a nivel del sistema nervioso central, llegando a la conclusión de que los perfiles farmacológicos son diferentes para cada uno de ellos cuando se utilizan los test estandarizados de antagonismo frente a triptamina, amfetamina, apomorfina y norepinefrina, de comportamiento frente a un autoestímulo intracraneal, acción cataleptogénica, ptosis palpebral y propiedades anticolinérgicas. Hay que resaltar además la consecuencia de que todos estos compuestos antagonistas de la dopamina, aunque tienen muchas propiedades comunes, no se pueden evaluar

por un solo test sino que se precisa una evaluación global comparativa de todos ellos.

En este momento, no disponemos de una serie de pruebas comparativas respecto a sus acciones sobre fibra lisa y por ello no podemos deducir tampoco, si las acciones farmacológicas que estos presentan pueden ser o no indicativas de un mecanismo de competición dopaminérgico.

La posible existencia de receptores presinápticos a nivel vesicular podría explicar algunas acciones farmacológicas que aparentemente se nos presentan como anómalas, como sería por ejemplo el caso de la acción estimulante que posee el haloperidol y el azaperone. Se ha demostrado la existencia de receptores presinápticos dopaminérgicos en la membrana nictitante del gato así como también en los nervios cardíacos simpáticos, siendo los responsables de las inhibiciones que se presentan por estímulo de los mismos. LOKHANDWALA (1979) ha analizado el efecto de la dopamina sobre los nervios cardíacos simpáticos del perro, revelando que se comportan como activadores presinápticos del receptor dopaminérgico presináptico. Parece ser que el papel fisiológico del receptor presináptico dopaminérgico está todavía por demostrar y pue en éstos jugar un papel importante no solo en corazón sino también en acciones vasculares que se comportarían de una manera análoga.

Se ha propuesto al 3', 5' - adenosin monofosfato ciclico (AMFp) como mediador de las acciones de la dopamina, fundamentalmente en los ganglios simpáticos. Las acciones sinápticas de la dopamina se pueden especificar debido a que producen una hiperpolarización o modificación de los potenciales postsinápticos y por otro lado, un aumento de las respuestas

a otros mediadores, como por ejemplo a la acetilcolina. Por tanto a la dopamina le correspondería un papel de estímulo propiamente dicho y otro de neuromodulador, es decir, neurotransmisor y neuromodulador.

LIBET (1979) postula que el primer fenómeno se realiza por intermedio del ciclo del AMPc, mientras que el segundo podría atribuirse al 3'5' - guanidimonofosfato cíclico (GMPc), en el sentido de que éste sería capaz de antagonizar las acciones neuromoduladoras de la dopamina.

La extrapolación de estos hallazgos a nivel vesical puede interpretarse por la existencia en la vejiga de formaciones ganglionares fundamentalmente parasimpáticas.

Se admiten dos tipos de receptores dopaminérgicos (TITELER y SEEMAN, 1978; SEEMAN et al. 1978), uno que podemos denominar receptor neuroléptico / dopaminérgico, que posee una baja afinidad por la dopamina (se requieren concentraciones μM de dopamina para inhibir la unión 3H - neuroléptico), receptor probablemente de tipo postsináptico, y otro receptor dopamina/apomorfina que tiene una elevada afinidad para ambos compuestos, (en el rango nM) y que por el contrario presenta una baja afinidad para los neurolépticos (en el rango μM), este receptor según NAGY et al. (1978) podría ser de tipo presináptico. Basándose en estos hechos mencionados, WHITAKER y SEEMAN (1979) llegan a la conclusión de que los receptores apomorfina /dopamina son diferentes de los receptores neuroléptico/dopamina.

Los estudios de QUIK e IVERSEN (1979), realizados a nivel del sistema nervioso central, se interpretan a la luz del comportamiento farmacológico de la 2 - amino - 6,7 - dihidroxitetralina (ADTN), agonista de do

pamina, agente muy específico y selectivo para el bloqueo de receptores dopaminérgicos, encontrándose que desplaza a la spiperona de los receptores sensibles a la adenilciclase. Esta sería otra posibilidad de acción de estos compuestos que actúan modificando la capacidad enzimática del mencionado enzima. En resumen se puede decir que el ADTN exhibe su capacidad competitiva frente a la dopamina a nivel de los receptores sensibles a la adenilciclase.

BURT et al. (1976) han analizado la potencia relativa de diferentes agentes agonistas sobre preparados de sistema nervioso central, encontrándose que la capacidad de unión de los agonistas de dopamina es en general varias veces superior a la del haloperidol, presentado sin embargo variaciones regionales dentro del cerebro, donde estas cifras no se cumplen taxativamente. Se puede afirmar que el receptor dopaminérgico sensible a la adenilciclase, correlaciona, en general muy bien, los efectos farmacológicos de las butirofenonas en lo que se refiere a su afinidad; llegándose a la conclusión de que el receptor de dopamina normalmente admitido, no es el mismo que el receptor dopaminérgico sensible a adenilciclase.

BELD et al. (1978) han llevado a cabo un estudio cinético del análisis del receptor dopaminérgico y después de observar el comportamiento de la spiperona frente a dopamina, apomorfina, haloperidol, butaclamol, y ergometrina, llegan a la conclusión de que la spiperona tiene dos tipos de unión con afinidades análogas. La inhibición de la unión de ^3H - spiperona por el butaclamol parece que se describe mejor con un modelo correspondiente a un solo receptor. Es obvio que el butaclamol no diferencia los lugares de unión. Sin embargo la inhibición del haloperidol se interpreta me

jor aceptando dos lugares de unión distintos en el receptor. La inhibición de la unión ^3H - spiperona por dopamina revela un lugar de unión con elevada afinidad ($K = 35 \text{ nM}$) y otro lugar con baja afinidad ($K = 12 \text{ }\mu\text{M}$). Al primero de ellos se le podría llamar receptor directo mientras que el segundo correspondería al receptor estimulante de la adenilciclase.

En ensayos anteriores se había observado que el nivel de la unión al receptor dopaminérgico, los agonistas desplazan a los agonistas más efectivamente que los antagonistas y viceversa. Este hecho se podría interpretar mejor mediante un modelo de receptor con dos lugares de unión. Ahora bien este receptor dual no parece explicar el comportamiento inhibitorio de agonistas y antagonistas. Otra interpretación posible podría ser un modelo de receptor alósterico, pero que sin embargo no resulta idóneo para explicar el fenómeno aparentemente anormal de unión que se presenta, como tampoco predice grandes diferencias entre el desplazamiento de agonistas por agonistas y de agonistas por antagonistas. Los hechos se interpretarían mejor admitiendo dos tipos de receptores, unos llamados receptores dopaminérgicos inhibitorios (DAi) y otros receptores dopaminérgicos excitatorios (DAe), pero debemos reconocer que nuestros resultados no son explicados de una manera tan convincente para llegar a firmes conclusiones.

Finalmente a la vista de nuestros resultados podemos justificar los hechos de la siguiente manera:

1º) Hay una unión de naturaleza específica que aparece como competitiva con los neurolepticos utilizados.

2º) No existe un antagonismo funcional de estos neurolepticos frente a la motilidad espontánea o a los estímulos eléctricos.

En cuanto al primer punto, los hallazgos anteriormente mencionados parecen justificar lo indicado, es decir, la existencia al menos de un receptor específico de alta afinidad en la vejiga y posiblemente otro no específico de baja afinidad.

En cuanto al segundo punto podría explicarse fácilmente de un modo simplista, admitiendo que los neurolepticos bloquearan el receptor dopaminérgico inhibitorio, (DAI), hecho que por supuesto tampoco puede deducirse de una interpretación cinética, aunque puede adaptarse a ella.

Otra posible interpretación de los hechos sería que los neurolepticos mencionados actuaran más sobre un receptor presináptico que sobre uno postsináptico, convirtiéndose en definitiva sus efectos en estimulantes; o bien, que bloquearan el efecto modulador del GLF_c perturbando por tanto los efectos del AMP_c, efecto que podría interpretarse seguramente por la posible acción alostérica si realmente llegase a existir.

En definitiva, podríamos plantear la cuestión de una manera simplista diciendo que los neurolepticos no tienen un efecto inhibitorio evidenciable funcionalmente a nivel vesical, aunque este efecto inhibitorio podría reflejarse en algunas acciones de feed - back que modulan las acciones de la dopamina o del AMP_c.

1000

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Con la finalidad de investigar la existencia de receptores dopaminérgicos en vejiga, se han llevado a cabo dos tipos de ensayos, uno de comportamiento farmacológico en tiras de vejiga, tiras denervadas, vejiga completa y preparados "in vivo", y otro realizando el análisis de receptores en animal entero o en preparados "in vitro" de vejiga.

Se han utilizado como fármacos agonistas fundamentalmente dopamina y apomorfina, y como supuestos antagonistas haloperidol, azaperone, spiperona y domperidon, verificándose todos los ensayos en vejiga de cobayo y llegándose a las siguientes conclusiones:

1º) La dopamina a concentraciones de 10^{-3} a 10^{-5} M actúa estimulando la motilidad espontánea. Este estímulo sólo es visible en tiras vesicales a concentraciones elevadas, de 10^{-3} M, mientras que a bajas concentraciones es más bien de tipo inhibitorio. En los otros preparados el efecto es siempre de tipo estimulatorio o bien sin modificación de la actividad a bajas concentraciones.

2º) Los efectos de la dopamina sobre el estímulo transmural en tiras vesicales, con o sin previa denervación, son siempre de tipo inhibitorio, variando proporcionalmente a la dosis utilizada y se manifiestan ostensiblemente a concentraciones de 10^{-4} M. Con estímulo coaxial en vejiga completa siempre se produce una inhibición de la contracción y de la actividad en general, algo más intensa que en los casos anteriores. La estimulación del nervio en el preparado de vejiga completa también origina una inhibición porcentualmente menor que en los casos anteriores.

3º) La dopamina se comporta como estimulante de la ritmicidad espontánea en todos los casos excepto en las tiras vesicales a concentraciones muy bajas, lo que hace preveer que el componente dopaminérgico vesical es siempre de tipo excitatorio, tanto en la que se refiere al tono como al ritmo y a la amplitud de las contracciones. Por el contrario los efectos de la dopamina sobre las respuestas a estímulo son siempre de tipo inhibitorio, siendo esta inhibición más intensa en los estímulos coaxiales que en los indirectos mediados a través de nervios, lo que indicaría la implicación en estos efectos de un factor o receptor presináptico además del postsináptico.

4º) Utilizando la apomorfina como agonista hemos encontrado que produce un efecto estimulante sobre la motilidad espontánea ya desde bajas concentraciones.

En lo que se refiere a las respuestas a estímulos, los efectos inhibitorios se manifiestan del mismo modo y en cuantía análoga a los observados con la dopamina, con excepción de los estímulos mediados a través de nervios, en los que parecen ligeramente mayores.

5º) La apomorfina se comporta como un agonista más perfecto que la dopamina, actuando en general a menor concentración y con un mayor efecto sobre el ritmo y la actividad de la fibra vesical.

6º) En todos los preparados utilizados el haloperidol se comporta como un estimulante de la actividad espontánea, siendo sus efectos muy paralelos a los de los compuestos anteriormente citados y en concentraciones muy similares.

7º) El haloperidol no inhibe el incremento de la motilidad espontánea provocado por dopamina o apomorfina, sino que más bien manifiesta cierto sinergismo en algunos casos y por lo tanto, bajo este punto de vista, no se presenta como antagonista.

8º) El haloperidol presenta un efecto inhibitorio sobre las respuestas a la estimulación eléctrica, más intenso que el originado por dopamina y apomorfina. Por lo tanto, como sucede con la motilidad espontánea, las respuestas son paralelas y con carácter de agonismo.

9º) Se ha observado que la acción inhibitoria producida por dopamina y apomorfina sobre las respuestas a estímulos eléctricos se potencia en presencia del haloperidol o no se modifica, encontrándonos, como en el caso de la motilidad espontánea, frente a un efecto agonista puro de estos compuestos.

10º) El azaperone se comporta en general como estimulante del ritmo, amplitud y tono, de modo análogo al haloperidol, no pudiéndose establecer diferencias respecto a la motilidad espontánea tanto "in vitro" como "in vivo".

11º) En todos los preparados estudiados, el azaperone presenta un efecto análogo al haloperidol en lo que se refiere a la inhibición de la contracción de respuesta a estímulos eléctricos, pudiendo establecerse el carácter más bien agonista de este fármaco.

12º) En los preparados "in vitro" e "in vivo" estudiados, tanto en lo que se refiere al comportamiento espontáneo como al inducido por

los estímulos eléctricos, no ha sido posible encontrar el antagonismo clásicamente establecido a nivel del sistema nervioso central o de otros preparados farmacológicos.

13º) Se ha encontrado una captación "in vivo" de ^3H - dopamina administrada por vía sistémica a la dosis de 10 mg/Kg, del 0,294 (\pm 0,019)% radiactividad/g de tejido respecto al total administrado, valor muy análogo a los observados en diferentes zonas del sistema nervioso central.

14º) El desplazamiento "in vivo" de ^3H - dopamina observado en presencia de diferentes antagonistas, a la dosis de 0,1 mg/Kg, es de un 49,96% para spiperona, 48,62% para el domperidon, 43,39% para el haloperidol, 38,16% para el F - 1943 y 22,75% para la metoclopramida, que representan valores muy significativos de competición por el receptor.

15º) El análisis de Scatchard de la unión "in vitro" de ^3H - dopamina en homogeneizado de vejiga de cobayo conduce a una curva bifásica con un componente saturable o específico para el rango de concentraciones de radioligando $7,5 \cdot 10^{-10}$ a $2,5 \cdot 10^{-9}$ M y un componente no saturable correspondiente al rango de $7,5 \cdot 10^{-9}$ a 10^{-3} M, teniendo el primero un coeficiente de correlación $r = 0,8284$ y una $K_A = 4,06 \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1}$, lo que indica una afinidad del receptor para la dopamina muy elevada.

16º) Los efectos concentración - dependiente de inhibidores dopaminérgicos convencionales sobre la captación de ^3H - dopamina (2,5 nM) en homogeneizado de vejiga han definido unos valores de CI_{50} de 0,16 nM para spiperona, 10 nM para domperidon y 20 $\mu\text{g/ml}$ para F - 1943.

17^e) A través de un estudio comparativo se deduce que los preparados de vejiga tienen una capacidad de captación específica de dopamina que es inhibida por bloqueantes dopaminérgicos convencionales, con un significado claro de competición frente a la captación por el receptor, pero presentando un significado funcional diferente.

/s/

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

- AMBACHE, N. and ZAR, M.: "Non-cholinergic transmission by post-ganglionic motor neurones in the mammalian bladder". J. Physiol. 210, 761-783, 1.970.
- ANADON, A.: "Estudio sobre la farmacología del desarrollo. Farmacología evolutiva del sistema purinérgico en fibra lisa neonatal o adulta". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 1.974.
- ANADON, A., MARTINEZ LARRAÑAGA, M.R. y SANZ SANCHEZ, F.: "Diferencias de captación y liberación de ³H-adenosin en fibras intestinales de taenia coli e íleon de neonatales y adultos". Arch. de Farmacol. y Toxicol. I, 165-172, 1.975.
- ANADON, A.: "Cronofarmacología del fenómeno de rebote producido por estímulos intramurales en intestino con inhibición vegetativa". Arch. de Farmacol. y Toxicol. II, 133-142, 1.976.
- AWAD, S.A., BRUC, A.W., CARRO-CIAMPI, C., DOWNIE, J.W. and LIN, M.: "Distribution of alpha and beta adrenoceptors in human urinary bladder". Br. J. Pharmacol. 50, 525-529, 1.974.
- BELD, A.J., KUIJER, B., RODRIGUEZ de MIRANDA, J.F. and WUOTERSE, A.C.: "Ligand binding to dopamine-receptors: analysis & interpretation". Life Sci. 23, 489 - 494. 1.978.
- BEST, C.H. and TAYLOR, N.B.: "The physiological basis of medical practice". The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 6th Ed. 483 - 484, 1.955.
- BLACK, J.W., DUNCAN, A.M., DURANT, C.J., GANELLIN, C.R. and PARSON, E.M. "Definition and antagonism of histamine H₂ receptors". Nature (Lond). 236, 385, 1.972.

- BLANCK, T.J.J. and GILLIS, C.N.: "Beta - adrenergic receptor ligand binding by rabbit lung". *Biochem. Pharmacol.* 28, 1903 - 1909 1.979.
- BURNSTOCK, G. and CAMPBELL, G.: "Comparative physiology of the vertebrate autonomic nervous system. II. Innervation of the urinary bladder of the ringtail possum (*Pseudocheirus peregrinus*)". *J. Exp. Biol.* 40, 421 - 436. 1.963.
- BURNSTOCK, G.: Neural nomenclature. *Nature* 229, 282, 1.971.
- BURNSTOCK, G., DUMSDAY, B. and SMYTHE, A.: "Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide". *Br. J. Pharmacol.* 44, 451 - 461, 1.972.
- BURKI, H.R.: "Correlation between ^3H - haloperidol binding in the striatum and brain amine metabolism in the rat after treatment with neuroleptics". *Life Sci.* 23, 437 - 442. 1.978.
- BURT, D.R., CREESE, I. and SNYDER, S.H.: "Binding interactions of lysergic acid diethylamide and related agents with dopamine - receptors in the brain". *Mol. Pharmacol.* 12, 631. 1.976.a.
- BURT, D.R., CREESE, I. and, SNYDER, S.H.: "Properties of ^3H - haloperidol and ^3H - dopamine binding associated with dopamine receptors in calf brain membranes". *Mol. Pharmacol.* 12, 800-812, 1.976b.
- BURT, D.R., ENNA, S.J., CREESE, I. and SNYDER, S.H.: "Dopamine receptor binding in the corpus striatum of mammalian brain". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4655, 1.975.
- BURY, R.W. and MASHFORD, M.L.: "The effects of metoclopramide in modi-

ifying the response of isolated guinea - pig ileum to various agonists. J. Pharmacol Exp. Ther. 197, 641 - 646. 1.976.

CARON, M.G. RAYMOND, V., LEFKOWITZ, R.J. and LABRIE, F.: "Identification of dopaminergic receptors in anterior pituitary: correlation with the dopaminergic control of prolactin release" Federation Proc. 36, 278, 1.977.

CARPENTER, F.G. and RAND, S.A.: "Relation of acetylcholine release to responses of the rat urinary bladder". J. Physiol. 180, 371 - 382. 1.965.

CHESCHER, G.B.: "Differentiation of receptors for exogenous and endogenous acetylcholine in the urinary bladder". Agents and Actions. 1, 128 - 132, 1.970.

CREESE, I. PROSSER, T. and, SNYDER, S.H.: "Dopamine receptor binding: specificity, localization and regulation by ions and guanylate nucleotides". Life Sci. 23, 495 - 500. 1.978.

CREESE, I., SCHNEIDER, R. and SNYDER, S.H.: "³H - spiroperidol labels dopamine receptors in pituitary and brain". Eur. J. Pharmacol. 46, 377 - 381, 1.977.

DALE, H.H. and GADDUM, J.H.: "Reactions of denervated voluntary muscle, and their bearing on the mode of action of parasympathetic and related nerves". J. Physiol. 70, 109 - 144. 1.930.

DAY, M.D. and BLOWER, R.R.: "Cardiovascular dopamine receptor stimulation antagonized by metoclopramide". J. Pharm. Pharmacol. 27, 276 - 278, 1.975.

DE SY, W.A.: "Pharmacological interference with the autonomic innervation

- tion of the urinary bladder of the cat". Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. suppl. 196,99 - 100, 1.972.
- DHARMANA, K.H., GUPTA, G.P. and BHARGAVA, K.P.: "Analysis of the adrenergic receptors in the urinary tract of dog". Jap. J. Pharmacol. 20, 461 - 466, 1.970.
- DUMSDAY, B.: "Atropine resistance of the urinary bladder innervation". J. Pharm. Pharmacol. 23, 222 - 225, 1.971.
- EDGE, N.D.: "A contribution to the innervation of the urinary bladder of the cat". J. Physiol. 127, 54 - 68, 1.955.
- EDVARDSEN, P.: "Nervous control of urinary bladder in cats". Acta Neurol. Scand. 43, 543 - 563, 1.967.
- EDVARDSEN, P.: "Nervous control of urinary bladder in cats. IV. Effects of autonomic blocking agents on responses to peripheral nerve stimulation". Acta Physiol. Scand. 72, 234 - 247, 1968.
- EDVARDSEN, P. and SETKLEIV, J.: "Distribution of adrenergic receptors in the urinary bladder of cats, rabbits and guinea-pigs". Acta Pharmacol. Toxicol. 26, 437 - 445, 1.968.
- EL - BADAWI, A. and SCHENK, E.A.: "Dual innervation of the mammalian urinary bladder. A histochemical study of the distribution of cholinergic and adrenergic nerves". Am. J. Anat. 119, 405 - 428, 1.966.
- ELMER M.: "Autonomic innervation of the rat urinary bladder". (Thesis) Institute of Physiology. University of Lund, Sweden. 1.975
- FELDBERG, W. and VARTIAINEN, A.: "Further observation on the physico-

- gy and pharmacology of a sympathetic ganglion". J. Physiol. 83, 103 - 128. 1.935.
- FERRI, S., REINA, R. and SANTAGOSTINO, A.: "Dopamine and the depressant action of morphine on stimulated guinea - pig ileum". Br. J. Pharmacol. 59, 25 - 28. 1.977.
- FREDERICKS, C.M.: "Characterization of the rabbit detrusor response to histamine through pharmacologic antagonism". Pharmacology, 13 (1), 5 - 11, 1.975.
- GADDUM, J.H. and PICARELLI, Z.P.: "Two kinds of tryptamine receptor". Br. J. Pharmacol. 12, 323 - 328, 1.957.
- GARRY, R.C. and GILLESPIE, J.S.: "The responses of the musculature of the colon of the rabbit to stimulation, in vitro, of the parasympathetic and of the sympathetic antifeeds". J. Physiol. 128, 557 - 576, 1.955.
- GIANNUZZI, M.J.: "Recherches physiologiques sur les nerfs moteurs de la vessie". J. Physiol. Paris, 6, 22 - 29, 1863.
- GOODMAN, L.S. and GILMAN, A.: "The pharmacological basis of therapeutics" The Macmillan Company, New York 1.970.
- GOLDBERG, L.I., VOLKMAN, P.H. and KOHLI, J.D.: "A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopamine receptors". Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18, 57 - 79. 1.978.
- GRUBER, C.M. "The autonomic innervation of the genito-urinary system". Physiol. Rev, 13, 497 - 609, 1.933.
- GUERRIN, F. MILBLED, G. MERVEILLE, P and HEQUET, B.: "Effets du métopropramide sur la motricité gastrique du rat". C.R. Soc. Biol.

151. 1318 - 1325, 1.967.

GYERMEK, L.: "Action of 5 - hydroxytryptamine on the urinary bladder of the dog". *Arche. Int. Pharmacodyn. Ther.* 87, 137 - 144, 1962.

HAMBERGER, B. and NORBERG, K.A.: "Adrenergic synaptic terminals and nerve cells in bladder ganglia of the cat". *Int. J. Neuropharmacol.* 4, 41 - 45, 1.965.

HARTLEY, E.J. and SEEMAN, P.: "The effect of varying ^3H - spiperone concentration on its binding parameters". *Life Sci.* 23, 513 - 518, 1.978.

HAY, A.M.: "Pharmacological analysis of the effects of metoclopramide on the guinea - pig isolated stomach". *Gastroenterology.* 72, 864 - 869, 1.977.

HEIMASNS, R.L.: "Catecholamines and the actions of morphine on the guinea pig ileum". *Ach. Int. Pharmacodyn.* 216, 11 - 18, 1.975.

HELBERG, R.J.: "Determination of carbon - 14 and tritium in blood and other whole tissues. Liquid. scintillation counting of tissues". *Anal. Chem.* 32, 42, 1.960.

HENDERSON, V.E. and ROEPKE, M.H.: "The rôle of acetylcholine in bladder contractile mechanisms and in parasympathetic ganglia". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 51, 97 - 111, 1.934.

HENDERSON, V.E. and ROEPKE, M.H.: "The urinary bladder mechanisms". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 54, 408 - 414, 1.935.

HOFFMANN, G.: "Les animaux de Laboratoire". p. 170, Vigot Freres, eds. Paris, 1.963.

- HUKOVIC, S., RAND, M.J. and VANDOV, S.: "Observations on an isolated, innervated preparation of rat urinary bladder". Br. J. Pharmacol. 24, 178 - 188, 1.965.
- IDOIPE, C.: "Exploración de nuevos receptores en vejiga". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Madrid 1.978.
- INGERSOLL, E.H., JONES, L.J. and HEGRE, E.S.: "Urinary bladder response to unilateral stimulation of hypogastric nerves". J. Mol. 72, 178 - 190, 1.954.
- JACOB, J., FILLON, G. and MICHAUD, G.: "Recepteurs morphiniques et leurs ligands". Actualités Pharmacologiques 30^e série, Masson. 113 - 158, 1.978.
- JENNER, P. and MARSDEN, C.D.: "The substituted benzamides - a novel class of dopamine antagonists". Life Sci, 25, 479 - 486, 1.979
- KAO, C.Y.: "Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena". Pharmacol. Rev., 18 997, 1966.
- KOSTERLITZ, H.W. AND WATT, A.J.: "Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone)". Br. J. Pharmacol. Chem 33, 266 - 276. 1.968.
- LADURON, P.M., JANSSEN, P.F.M. and LEYSEN, J.E.: "Regional distribution and in vivo displacement of neuroleptic drugs". Biochem. Pharmacol. 27, 317 - 321, 1.978.a.
- LADURON, P.M., JANSSEN, P.F.M. and LEYSEN, J.E.: "Subcellular distribution of neuroleptic drugs and their receptors in various rat brain areas". Biochem. Pharmacol. 27, 323-328, 1978.b

- LAI, J.C.K. and CLARK, J.B.: "Preparation and properties of mitochondria derived from synaptosomes". *Biochem. J.* 154, 423 - 432, 1.976.
- LANGLEY, J.N. and ANDERSON, H.K.: "The innervation of the pelvic and adjoining viscera. II. The Bladder". *J. Physiol.* 19, 7184, 1.895.
- LEVY, B. and AHLQUIST, R.P.: "A study of sympathetic ganglionic stimulants". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 137, 219 - 228, 1.962.
- LEWI, P.J.: "Classification of dopamine - antagonists from pharmacological data". *Life Sci.* 23, 519 - 522, 1.978.
- LEYSEN, J.E. and GOMMEREN, W.: "Different kinetic properties of neuroleptic receptor binding in the rat striatum and frontal cortex". *Life Sci.* 23, 447 - 452, 1.978.
- LEYSEN, J.E., GOMMEREN, W. and LADURON, P.M.: "Kinetics and characteristics of in vitro binding". *Biochem. Pharmacol.* 27, 307-316, 1.978.
- LEYSEN, J.E., GOMMEREN, W. and LADURON, P.M.: "Distinction between dopaminergic and serotonergic components of neuroleptic - binding sites in limbic brain areas". *Biochem. Pharmacol.* 28, 447 - 448, 1.979.
- LEYSEN, J.E. and LADURON, P.M.: "Receptors of dopamine antagonists: new biochemical approaches". *Life Sci.* 23, 419 - 420, 1.978.
- LIBET, B.: "Which postsynaptic action of dopamine is mediated by cyclic AMP?". *Life Sci.* 24, 1043 - 1058, 1.979.
- LOKHANDWALA, M.F.: "Presynaptic receptor systems on cardiac sympathetic

- nerves". *Life Sci.* 24, 1823 - 1832, 1.979.
- MANTEGAZZA, P., and NAIMZADA, K.M.: "Observations on an isolated preparation of guinea-pig urinary bladder stimulated through the hypogastric nerves". *Eur. J. Pharmacol.* 1, 396-401, 1.967 a.
- MANTEGAZZA, P. and NAIMZADA, K.M.: "Responses of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder to hypogastric nerve stimulation in vivo". *Eur. J. Pharmacol.* 1, 402 - 406, 1.967 b.
- MASARU KURV: "Nervous control of micturition". *Physiol. Rev.* Vol 45, no 5, 1.965.
- NAGY, J.I., LEE, T., SEEMAN, P. and FIBIGER, H.C.: "Direct evidence for presynaptic and postsynaptic dopamine receptors in brain". *Nature* 274, 278, 1.978.
- NERGARDH, A. and BOREUS, L.O.: "Autonomic receptor function in the lower urinary tract of man and cat". *Scand. J. Urol. Nephrol.* 6 32 - 36, 1.972.
- NIEMEGERERS, C.J.E. and JANSEN, P.A.J.: "A systematic study of the pharmacological activities of dopamine antagonists". *Life Sci.* 24, 2201 - 2216, 1.979.
- OSBORN, D.: "The alpha adrenergic receptor mediated increase in guinea-pig liver glycogenolysis". *Biochem. Pharmacol.* 27, 1319-1324, 1.978.
- PATON, W.D.M. and PERRY, W.L.H.: "The relationship between depolarization and block in the cat's superior cervical ganglion". *J. Physiol. Lond.* 119, 43, 1.953.

- PENG, C.T.: "Chemiluminescence and phosphorescence in liquid scintillation counting". Comunicación al Special Applications of liquid scintillation counting. California Marzo. 1973.
- QUICK, M. and IVERSEN, L.L.: "Regional study of ^3H - spiperone binding and the dopamine - sensitive adenylate cyclase in rat - brain". Eur. J. Pharmacol. 56, 323 - 330, 1979.
- SALIMI, M., SETEKLEIV, J. and SKOBBA, J.J.: "The sensitivity of adrenergic excitatory and inhibitory receptors in the smooth muscle of rabbit urinary bladder". Acta Pharmacol. Toxicol. 27, 213 - 224, 1969.
- SAUM, W.R. and de GROAT, W.C.: "The actions of 5 - hydroxytryptamine on the urinary bladder and on vesical autonomic ganglia in the cat". J. Pharmacol. Exp. Ther. 165, 70 - 83, 1973.
- SEEMAN, P., CHAU-WONG, M., TEDESCO, J. and WONG, K.: "Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4376, 1975.
- SEEMAN, P., LEE, T., CHAU-WONG, M., TEDESCO, J. and WONG, K.: "Dopamine receptors in human and calf brains using ^3H - apomorphine and an antipsychotic drug". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 4354, 1976.
- SEEMAN, P., TEDESCO, J., TITELER, M. and HARTLEY, E.J.: "Anti - schizophrenic drugs: membrane sites of action". Advan. Pharmacol. Therap. Vol. 5, Neuropsychopharmacology, ed. C. Dumort (Pergamon Press, Oxford), p.3. 1978.
- SEEMAN, P., WESTMAN, K., PROTIVA, M., JILEK, J., JAIN, P.C., SAXENA, A.K.,

- ANAND, N., HUMBER, L. and PHILIPP, A.: "Neuroleptic receptors: stereoselectivity for neuroleptic enantiomers". Eur. J. Pharmacol. 56, 247 - 251, 1.979.
- SIGG, E.B. and SIGG, T.O.: Sympathetic stimulation and blockade of the urinary bladder in cat". Int. J. Neuropharmac. 3, 241 - 251, 1.964.
- SINGH, I.: "Release of "neurokinin" on nervous and electrical stimulation of a frog stomach muscle preparation". Br. J. Pharmacol. 22, 403 - 407, 1.964.
- SJOGREN, C., SJOSTRAND, S.V., CARLSSON, S. and SCHMITERLOW, C.G.: " - Structure - activity relationship of a series of quaternary ammonium compounds on the urinary bladder in vitro" Acta Pharm. Succica, 12 (1), 37 - 40, 1.975.
- SJOSTRAND, S.E., SJOGREN, C. and SCHMITERLOW, C.G.: "Responses of the rabbit and cat urinary bladders in situ to drugs and to nerve stimulation". Acta Pharmacol. Toxicol. 34, 241 - 254, 1.972.
- SMITH, J.C.: "Pharmacologic interactions with 4 - (m-chlorophenyl-carbamoyloxy)-2-butyrimethylammonium chloride, a sympathetic stimulant". J. Pharmacol. Exp. Ther. 153, 276-284 1.966.
- SUNDIN, T. and DAHLSTROM, ANNICA: "The sympathetic innervation of the urinary bladder and urethra in the normal state and after parasympathetic denervation at the spinal root level". Scand. J. Urol. Nephrol. 7, 131 - 149, 1.973.

TAIRA, N., MATSUHURA, S. and HASHIMOTO, K.: "Effect of tetrodotoxin on the bladder response to pelvic nerve stimulation and intra - arterial 1, 1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide and acetylcholine in the dog". Tohoku. J. Exp. Med. 97, 283 - 288, 1.969.

TAIRA, N., NATSUMURA, S. and HASHIMOTO, K.: "Excitation of the parasympathetic ganglia of the canin urinary bladder thorough a muscarinic mechanism". J. Pharmacol. Exp. Ther. 176, 93-100, 1.971.

TRENDELENBURG, V.: Transmission of preganglionic impulses though the muscarinic receptors of the superior cervical ganglio of the cat". J. Pharmacol. Exp. Ther. 154, 426 - 440, 1.966

TITELER, M. and SEEMAN, P.: "Antiparkinsonian drug doses and neuroleptic receptors" Experientia. 34, 1490, 1.978.

URSILLO, R.C. and CLARK, B.B.: "The action of atropine an the urinary bladder of the dog and on the isolated nerve-bladder strip preparation of the rabbit". J. Pharmacol. Exp. Ther. 118, 338, 347, 1.956,

URSILLO, R.C.: "Investigation of certain aspects of atropine resistant nerve effects". J. Pharmacol. Exp. Ther. 131, 231 - 236 1.961.

VAN NUETEN, J.M., ENNIS, C., HELSEN, L., LADURON, P.M. and JANSSEN, P. A.J.: "Inhibition of dopamine receptors in the stomach: an explanation of the gastrokinetic properties of dompe ridone". Life Sci. 23, 453 - 458, 1.978.

- VARMUZA, S.L., WONG, YU-W. and MISHRA, R.K.: "³H - haloperidol binding: some theoretical aspects" Life Sci. 23, 471 - 474, 1978
- WAKADE, A.R. and KIRPEKAR, S.M.: "Sympathetic innervation of urinary bladder of the guinea-pig". Am. J. Physiol. 223, 1477 - 1480 1972.
- WALKER, J.L. and WEETMAN, D.F.: "Oxotremorine induced hypertension in the anaesthetized rat" Br. J. Pharmacol. 39, 490, 1970.
- WARD, A. and TAKEMORI, A.E.: "Studies on the narcotic receptor in the guinea-pig ileum". J. Pharmacol. Exp. Ther. 199, 117-123, 1976 a.
- WARD, A. and TAKEMORI, A.E.: "Effect of 6 - hydroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine on the response of the coaxially stimulated guinea - pig ileum to morphine". J. Pharmacol. Exp. Ther. 199, 124 - 130, 1976 b.
- WEETMAN, D.F.: "The guinea - pig isolated, innervated bladder preparation the effects of some autonomic drugs". Arch. Int. Pharmacodyn. 196. 383 - 392, 1972.
- WEETMAN, D.F. and TURNER, N.: "The effect of ganglion blocking agents on the isolated, innervated bladder of the guinea - pig". Arch. Int. Pharmacodyn. 201, 100 - 105, 1973.
- WEETMAN, D.F. and TUENER, N.: "The effects of inhibitors of adenosine 5'-triphosphate biosynthesis on the responses of the guinea-pig isolated bladder and some other preparations to nerve stimulation". Arch. Int. Pharmacodyn. 210, 12 - 26. 1974.

WHITAKER, P.M. and SEEMAN, P.: "Selective labeling of apomorphine receptors by ^3H - LSD". Eur. J. Pharmacol. 56. 269 - 271. 1979

